

EINFLUSS EINER IL-7 BEHANDLUNG BEI SEPSIS AUF DIE  
LANGFRISTIGE REKONSTITUTION DER T-ZELL-ZAHL, -FUNKTION  
UND DIVERSITÄT

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

*(doctor medicine (Dr. med.))*

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**Von Christoph Ammer-Herrmenau  
geboren am 29.10.1990 in Potsdam**

Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2020

**Gutachter**

- 1. Prof. Dr. med. Thomas Kamradt, Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Michael Bauer, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Tim Sparwasser, Mainz**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.01.2020**

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis .....	II
1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Definitionen und Mortalitätsstudien zu Sepsis .....	3
2.2	Langzeitmortalität bei Sepsis.....	4
2.3	Pathophysiologie der Sepsis .....	5
2.4	T-Zellen .....	9
2.5	T-Zellen bei Sepsis.....	12
2.6	IL-7-Therapie bei Sepsis .....	14
3	Zielsetzung.....	17
4	Publizierte Originalarbeiten .....	18
4.1	IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells, Upasana Kulkarni*, Christoph Herrmenau*, Stephanie J. Win, Michael Bauer, Thomas Kamradt, PLoS ONE 13(2): e0192304, 14 Seiten, 2018.....	18
4.2	Sepsis induces long-lasting impairments in T helper cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations, Christoph Ammer-Herrmenau, Upasana Kulkarni, Nico Andreas, Martin Ungelenk, Sarina Ravens, Angela Kather, Christian Hübner, Ingo Kurth, Michael Bauer, Thomas Kamradt, PLoS One. 14(2): e0211716, 16 Seiten, 2019 .....	19
5	Diskussion.....	20
5.1	Sepsis bei Mäusen und Übertragbarkeit auf den Menschen .....	20
5.2	Dauer und Ausprägung der Lymphopenie, Einfluss von IL-7 und Vergleich der PCI- und CLP-Modelle .....	21
5.3	Eingeschränkte T-Zellantwort trotz wiederhergestellter T-Zell-Zahl.....	23
5.4	Rekonstitution von T-Zellen: Homöostatische Proliferation (HP) und Integration von recent thymic emigrants (RTEs) .....	24
5.5	TZR-Diversitätsanalyse und der Effekt von IL-7 auf das TZR Repertoire....	26
5.6	Suppression der T-Zellen durch regulatorische Zellen .....	28
5.7	IL-7-Therapie und ihre Auswirkung auf die Sepsismortalität .....	29
6	Schlussfolgerungen.....	32
7	Literaturverzeichnis .....	34
8	Anhang.....	41
8.1	Lebenslauf.....	41
8.2	Danksagung .....	44
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung .....	45

## II. Abkürzungsverzeichnis

°C: Grad Celsius

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

µm: Mikrometer

ACCP/ SCCM: An American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference

AMPK: AMP-aktivierende Kinase

APZ: Antigen präsentierende Zellen

Bregs: B-regulatorische Zellen

CD: cluster of differentiation

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CDR: complementarity-determining region

CFA: complete Freund's adjuvant

CLP: cecal ligation and puncture

CM: central memory cell

CO<sub>2</sub>: Kohlenstoffdioxid

d: day/ Tag

DZ: dendritische Zellen

DN: double negative

DNA: deoxyribonucleic acid

DTH: delayed-type hypersensitivity

EM: effector memory cell

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FiO<sub>2</sub>: fraction of inspired oxygen

Fig.: figure

GALT: gut-associated lymphoid tissues

GFP: green fluorescent protein

GlIT: gliotoxin sulfhydryl oxidase

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

h: hour/ Stunde

HIV: humanes Immundefizienz-Virus  
HP: homöostatische Proliferation  
HT-sequencing: high-throughput sequencing  
IL: Interleukin  
i.m.: intramuskulär  
i.p.: intraperitoneal  
i.v.: intravenös  
IFN: Interferon  
Ig: Immunglobulin  
IMGT: Immunogenetics  
kg: Kilogramm  
LPS: Lipopolysaccharide  
mAb: monoclonal antibody  
MDSC: myeloid derived suppressor cells  
MHC: major histocompatibility complex  
mg: Milligramm  
ml: Milliliter  
mM: Millimolar  
mTOR: mechanistic Target of Rapamycin  
NGS: next generation sequencing  
NK: natürliche Killerzellen  
PaO<sub>2</sub>: partial pressure of oxygen  
PCI: peritoneal contamination and infection  
PCR: polymerase chain reaction  
PD-1: programmed cell death protein-1  
PICS: persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome  
qSOFA: quick sequential organ failure assessment  
rhIL: recombinant human Interleukin  
RNA: ribonucleic acid  
ROS: reactive oxygen species  
RTE: recent thymic emigrants

s.c.: subkutan

SOFA: sequential organ failure assessment

Tab.: Tabelle

T<sub>C</sub>: zytotoxische T-Zellen

T<sub>H</sub> 1 bzw. 2: T-Helferzellen 1 bzw. 2

TLR: toll-like receptors

TNF: tumor necrosis factor

Tregs: T-regulatorische Zellen

TZR: T-Zell-Rezeptor

WT: Wild type

ZNS: zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

Sepsis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einer Mortalität von 50% und stellt eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen dar. Dabei ist anzumerken, dass trotz intensiver Forschung die grundlegende Pathophysiologie noch nicht abschließend geklärt ist. Nach dem aktuellen Verständnis wird die Sepsis als eine immunologische Fehlreaktion auf Pathogene und/ oder deren Produkte gesehen. Dabei kommt es zunächst zu einer massiven Entzündungsreaktion mit verstärkter Zytokinausschüttung. Gleichzeitig steuert das Immunsystem durch diverse Mechanismen gegen diese Proinflammation. Eine Immunsuppression ist eine gefürchtete Folge der akuten Sepsis, die wiederum eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber weiteren Pathogenen bedingt. Im Zuge dieser antiinflammatorischen Reaktion werden sämtliche Zellsysteme des Immunsystems einer dramatischen Veränderung unterworfen. Unter anderem unterliegen 50% der T- und B-Lymphozyten dem programmierten Zelltod.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich vor allem auf die T-Zellen, welche zentrale Zellen des adaptiven Immunsystems und somit wichtig für die spezifische Bekämpfung von Pathogenen sind. T-Zellen stehen aktuell im Mittelpunkt immunmodulierender Therapieansätze der Sepsis. Eine aktuelle Herangehensweise besteht darin, mit dem T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin-7 (IL-7) eine neue Behandlungsmöglichkeit der Sepsis (neben der alleinigen Antibiotikatherapie und Herdsanierung) zu etablieren.

Für die durchgeführten Experimente wurde das an der Universitätsmedizin Jena entwickelte „Peritoneal contamination and infection“ (PCI)-Modell genutzt. Dabei wird Wildtyp-Mäusen humane Stuhlsuspension intraperitoneal injiziert. Die dadurch hervorgerufene Sepsis wird mit Antibiotika behandelt. Die überlebenden Mäuse werden anschließend zu bestimmten Zeitpunkten nach der Sepsisinduktion analysiert. Es wurde die Rekonstitution der T-Zellen septischer Mäuse mittels Durchflusszytometrie und der next generation sequencing (NGS)-Methodik untersucht. Für die Analysen wurden T-Zellen aus der Milz, Knochenmark und den Lymphknoten verwendet. Die T-Zell-Zahl erreichte 3 Tage nach PCI ihren Tiefpunkt mit einer Reduktion derselben um 50%. Daraufhin erholten sich die T-Zellen innerhalb der nächsten 5 Tage. Mittels der NGS-Methodik konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass ab dem 8. Tag nach der Sepsisinduktion keine

Einschränkung der T-Zell-Rezeptor (TZR)-Diversität bestand. Auch der Thymus, welcher in der akuten Phase der Sepsis fast vollständig involierte, erholte sich innerhalb der ersten Woche nach Sepsisinduktion.

Mittels transgener Mäuse (B6.Rag2-GFP) wurde die Effizienz des Thymus nach Sepsis erforscht. Die frisch aus dem Thymus emigrierten T-Zellen (*recent thymic emigrants* (RTEs)) waren lediglich für die T-Helferzellen in der akuten Phase der Sepsis vermindert in der Peripherie nachweisbar.

Somit lässt sich bereits nach 8 Tagen post PCI von einem gut rekonstituierten T-Zell-Kompartiment ausgehen. Daraufhin führten wir ein Experiment durch, das die Funktion der T-Zellen adressierte. Hierbei wurden septische und unbehandelte Mäuse mit einem Aspergillus Antigen 30 Tage nach Sepsisinduktion immunisiert. Interessanterweise wiesen die septischen Tiere trotz normaler T-Zell-Zahl und TZR-Diversität eine signifikant schwächere T-Zell-Antwort gegen dieses Antigen auf.

Prominent war eine weitere Gruppe stark proliferierter Immunzellen. Bis zu 3,5 Monate nach Sepsis konnten vermehrt antiinflammatorische Zellen detektiert werden. Vor allem die B-regulatorischen Zellen (Bregs) und die Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) waren im Vergleich zu den gesunden Tieren um ein Vielfaches erhöht. Die MDSCs zeigten in den Experimenten eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von aktivierten T-Zellen. Es ist demnach anzunehmen, dass die lang persistierenden antiinflammatorischen Zellen für die, im Rahmen einer Sepsis andauernde, Immunsuppression mitverantwortlich sind.

In einem weiterführenden Versuchsansatz wurde IL-7 als vielversprechendes Zytokin für die Behandlung von Sepsis untersucht. Bei einer Dosierung, gleich der in Studien anderer Arbeitsgruppen, konnte kein Effekt bezüglich der Mortalität festgestellt werden. Auch schnitten die mit IL-7 behandelten septischen Mäuse im Immunisierungsversuch mit dem Aspergillus Antigen nicht besser ab, als die Unbehandelten. Weiterhin zeigte sich eine IL-7 getriggerte Proliferation von regulatorischen Zellen, welche möglicherweise einen immunsuppressiven Aspekt nach sich zieht. Dies gilt es in zukünftigen Studien weiter zu berücksichtigen und zu untersuchen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich die T-Zell-Zahl nach Sepsis rasch erholt, wobei jedoch die Funktion der T-Zellen auch nach Applikation von IL-7 weiterhin eingeschränkt bleibt.



## 2 Einleitung

### 2.1 Definitionen und Mortalitätsstudien zu Sepsis

Sepsis ist eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen in Deutschland und nimmt den 8. Platz der Todesursachen der Gesamtbevölkerung ein. Die Inzidenz betrug 2013 in der Bundesrepublik 279530 Fälle mit über 67849 letalen Ausgängen (Fleischmann et al. 2016). In einer multizentrischen deutschen Studie aus dem Jahr 2007 wurde sogar eine Mortalität von 50% verzeichnet (Engel et al. 2007).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen weitere multizentrische prospektive und retrospektive Studien in verschiedenen Industrienationen. Dies verdeutlicht, dass Sepsis eine große medizinische Herausforderung darstellt (Angus et al. 2001, Finfer et al. 2004).

2016 wurde durch die Konsensusgesellschaft (An American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference ACCP/ SCCM) die aktuellste Definition einer Sepsis formuliert. Diese fußt auf klinischen Studien, in die mehr als 700.000 PatientInnen eingeschlossen wurden (Singer et al. 2016).

Sepsis ist demnach eine dysregulierte Immunantwort auf eine mutmaßliche Infektion, die zu einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion führt.

Ein septischer Schock liegt vor, wenn zusätzlich eine therapierefraktäre Hypotension und eine Laktatserumkonzentration  $> 2 \text{ mmol/l}$  nach Volumengabe vorliegen.

Die Organdysfunktionen werden als SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) Score subsummiert und sind in Tabelle 1 dargestellt (Seymour et al. 2016).

Organ	Parameter	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.
<b>Lungenfunktion</b>	$P_{aO_2}/F_{iO_2}$	$<400$	$<300$	$<200$ (Beatmung)	$<100$ (Beatmung)
<b>Nierenfunktion</b>	Kreatinin (mg/dl)	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9 bzw. Oligurie	$>5$ bzw. Anurie
<b>Leberfunktion</b>	Bilirubin (mg/dl)	1,2-1,9	2,0-5,9	6-11,9	$>12$
<b>Kreislauffunktion</b>	Mittlerer art. Druck (+/- Katecholamine)	$<70$	niedrige Katecholamindosis	mittlere Katecholamindosis	hohe Katecholamindosis
<b>Thrombozyten</b>	$(1.000/\text{mm}^3)$	$<150$	$<100$	$<50$	$<20$
<b>ZNS</b>	Glasgow Coma Scale	13-14	10-12	6-9	$<6$
Anstieg $> 2$ Punkte spricht für eine Organdysfunktion					

Tab. 1: Der Sofa Score bestimmt die Organversagen, die nach neuer Definition für die Diagnose einer Sepsis essenziell ist.

Im Alltag wurde zudem eine vereinfachtere Variante des SOFA-Scores etabliert, um PatientInnen schnell als septisch definieren zu können. Dieser Quick-SOFA (qSOFA) enthält untenstehende Parameter (Seymour et al. 2016).

1. Atemfrequenz:  $>22/\text{min}$
2. Systolischer Blutdruck:  $<100 \text{ mmHg}$
3. ZNS: Vigilanzminderung bzw. veränderter mentaler Status

## 2.2 Langzeitmortalität bei Sepsis

In den oben zitierten multizentrischen Studien wurden Daten entweder bis zur Entlassung der PatientInnen oder selten 90 Tage nach der Entlassung stichprobenartig erhoben. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die bereits erwähnte Mortalität von 50% innerhalb eines 28 Tage Zeitraum erfasst worden ist.

Weitere Untersuchungen groß angelegter, ebenfalls multizentrischer Studien führten jedoch zu dem Ergebnis, dass auch nach Krankenhausentlassung eine erhöhte Mortalität beobachtet wurde. Ein Jahr nach Krankenhausaufenthalt war bereits ein Drittel der Sepsisüberlebenden verstorben. Nach zwei Jahren lebte lediglich die Hälfte der PatientInnen (Yende et al. 2016, Linder et al. 2014, Winters et al. 2010). Prescott et al. arbeiteten heraus, dass mehr als 20% der Sepsis Überlebenden in den folgenden Jahren unabhängig vom präseptischen Gesundheitszustand versterben. Offensichtlich scheint dieses frühzeitige Versterben unabhängig von vorbestehenden Grunderkrankungen lediglich durch die Sepsis bedingt zu sein (Prescott et al. 2016). Bei der Literaturrecherche fiel auf, dass bis heute die epidemiologische Kausalität und der biologische Mechanismus der Langzeitsterblichkeit nicht befriedigend erklärt werden können. Die meisten Studien sind deskriptive Analysen, die die Todesursachen nicht erforschen, sondern sich vor allem auf die eingeschränkte Lebensqualität der Sepsisüberlebenden fokussieren (Shankar-Hari und Rubenfeld 2016). Des Weiteren wird in den meisten publizierten Studien der präseptische Gesundheitszustand nur unzureichend beachtet (Shankar-Hari et al. 2016). Es fehlen zudem geeignete Kontrollarme. Eine Ausnahme stellt die Publikation von Yende et al. dar, in der postuliert wird, dass die erhöhte Sterblichkeit unter anderem kardiovaskulär bedingt ist und die Schwere der Sepsis mit der Häufigkeit eines kardiovaskulären Ereignisses (Apoplex und Herzinfarkt) korreliert (Yende et al. 2014).

Der größte Teil der Sepsisstudien und -forschungen fokussiert sich auf die ersten Tage nach Sepsisbeginn vor dem Hintergrund die Kurzzeitmortalität zu minimieren. Die Langzeitmortalitätsforschung wird dabei vernachlässigt (Angus 2010).

Um die Lücken der Forschung über die Langzeiteffekte der Sepsis zunehmend zu füllen, wurden in unserem Institut Untersuchungen an menschlichem Blut und Experimente an Mäusen durchgeführt. In diesen sollten grundlegende pathophysiologische Elemente der Sepsis beschrieben und erklärt werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem murinen Teil der Sepsisforschung.

### 2.3 Pathophysiologie der Sepsis

Wie die Definition bereits vermuten lässt, handelt es sich bei der Sepsis um ein komplexes heterogenes Krankheitsphänomen, das bis heute noch nicht in seiner ganzen Pathophysiologie verstanden wurde (Hotchkiss et al. 2016).

In der Initialphase der Sepsis wird ein massiver Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen beschrieben, der auch als „Zytokinsturm“ bezeichnet wird. Dabei handelt es sich u.a. um die Zytokine Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6. Bei dieser Hyperinflammation kann es zu febrilen Temperaturen, kardiovaskulärem Kollaps, Multiorganversagen, Schockzuständen oder zum Tod der PatientInnen kommen (Hotchkiss et al. 2016).

Seit einigen Jahren dominiert das Sepsismodell, nach dem der proinflammatorische Zytokinsturm mit einer parallel verlaufenden Immunsuppression einhergeht, die u.a. mit einer erhöhten Konzentration von antiinflammatorischen Zytokinen (wie IL-10) im Blut charakterisiert ist (Ayala et al. 2001, Venet et al. 2004, Hotchkiss et al. 2016). Im Vordergrund steht hierbei die Apoptose verschiedener Immunzellen in den lymphatischen Organen wie Milz, Thymus, Lymphknoten und *gut-associated lymphoid tissues* (GALT) (Hotchkiss et al. 1999). Weiterhin zeigen die überlebenden Zellen eine immunologische Dysfunktion. Die ausgeprägte Reduktion von Immunzellen und die immunologische Dysfunktion der verbliebenen Zellen generiert einen Zustand der Immunsuppression, der eine Sekundärinfektion begünstigt oder zum Persistieren eines Infektfokus führt und als Haupttodesursache in der akuten Sepsis angesehen wird (Otto et al. 2011, Torgersen et al. 2009, Monneret et al. 2004).

Der Organismus kann der schweren Infektion, die eine Sepsis provoziert, mit zwei verschiedenen Mechanismen begegnen: Resistenz und Toleranz. Resistenz bezeichnet alle Strategien, die Keimlast zu reduzieren und die invadierenden

Mikroorganismen zu eliminieren. Unter Toleranz werden alle Vorgänge subsumiert, die den Schaden an den durch Sepsis beschädigten Organen kontrollieren und Reparaturvorgänge fördern, ohne die Pathogenanzahl zu reduzieren. Dies führt einerseits zur Besserung des Allgemeinzustandes, kann jedoch auch zur Folge haben, dass die Infektion persistiert. Ein Gleichgewicht zwischen Krankheitstoleranz und -resistenz ist für das Überwinden einer Sepsis notwendig. Interessante therapeutische Ansätze adressieren diese Homöostase unter anderem durch Manipulation von mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) und AMP-aktivierende Kinase (AMPK) (Bauer et al. 2018). Da die vorliegende Arbeit sich vor allem mit dem Hauptspieler der Resistenz, nämlich dem Immunsystem, beschäftigt, soll im Folgenden das Zusammenspiel von Zytokinen und zellulärer Abwehr bei einer Sepsis, sowie deren Folgen erläutern werden.

Neutrophile Granulozyten übernehmen in der akuten Phase einen Großteil der zellulären Abwehr gegen eindringende Pathogene. Konträr zu anderen Zellpopulationen weisen die neutrophilen Granulozyten bei einem septischen Geschehen eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose auf. Zusätzlich kommt es zu einem vermehrten Ausstrom von Neutrophilen aus dem Knochenmark. In der Peripherie weisen diese unterschiedlichste Reifestadien auf (Tamayo et al. 2012). Die zirkulierenden Granulozyten sind in ihrer Funktionalität eingeschränkt. Sie sind weniger effektiv bei der Bekämpfung von Bakterien, haben eine verminderte reactive oxygen species (ROS) Produktion und eine reduzierte Fähigkeit ins infizierte Gewebe zu migrieren (Alves-Filho et al. 2010). Weiterhin zeigten eine murine Studie, dass der Schweregrad der Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten mit dem Auftreten von Sekundärinfektionen korreliert (Delano et al. 2011). Des Weiteren wurden neutrophile Granulozyten identifiziert, welche eine große Menge IL-10 produzieren (Kasten et al. 2010a).

Eine Gruppe von myeloiden Vorläuferzellen (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) wird im Knochenmark vermehrt gebildet und persistiert viele Tage bis Monate im Blut, im Knochenmark und in sekundären Lymphorganen. Diese Zellen haben eine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung gegenüber T-Zellen (Delano et al. 2007, Kulkarni et al. 2018). Die Höhe der im peripheren Blut nachgewiesenen MDSCs korreliert mit der Mortalität und längerem Verbleib auf der Intensivstation (Mathias et al. 2017).

Diese bei Sepsis beobachtete Myelo-/ Granulopoese führt nicht nur zu einer Immunsuppression, sondern kann auch in vielen Fällen eine persistierende Inflammation bewirken. Dieser Zustand wird als „*Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome*“ (PICS) bezeichnet. Dieses Phänomen wird regelmäßig bei kritisch Kranken mit längerem Intensivstation Aufenthalt (>14 Tage) nach schwerem Traumen oder Infektionen diagnostiziert. Charakteristika für das PICS sind erhöhte Entzündungswerte, eine Lymphopenie, reduzierte Albumin-, Kreatinin-Werte und Gewichtsverlust (Mira et al. 2017).

Dendritische Zellen (DZs), sowohl plasmazytoide als auch myeloide, sind von massiver Apoptose betroffen (Hotchkiss et al. 2002). Eine Studie bringt diese Reduktion der zirkulierenden DZs und eine erhöhte Mortalität in Zusammenhang (Guisset et al. 2007). Die überlebenden DZs produzieren vermehrt IL-10 und zeigten eine reduzierte Major histocompatibility complex II Expression (MHCII). Faivre et al. veröffentlichte Experimente mit Blut septischer PatientInnen, die zeigen, dass die DZ Interaktion mit den T-Zellen zu Anergie der letztgenannten und zur Proliferation von regulatorischen T-Zellen führt (Faivre et al. 2012).

Auch Monozyten und Makrophagen erfahren drastische Veränderungen. Diese setzen unter septischen Bedingungen bei einem Stimulus durch Lipopolysaccharide (LPS) oder einem anderen Toll-like-receptor (TLR)-Agonisten weniger proinflammatorische, dafür vermehrt antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10, frei. Hierbei spricht man vom Phänomen der Endotoxin-Toleranz (Biswas und Lopez-Collazo 2009). Zur erhöhten suppressiv wirkenden Interleukin-Freisetzung kommt die verminderte Expression von MHCII hinzu. In einer kleinen Studie an 20 septischen PatientInnen konnte gezeigt werden, dass die verminderte MHCII Expression und die vermehrte Expression von IL-10 mRNA mit einer schlechteren Prognose korreliert (Abe et al. 2008).

Die massive Apoptose von Lymphozyten wird in vielen Studien prominent hervorgehoben (Hotchkiss et al. 1999, Felmet et al. 2005). Es lohnt sich, v.a. in Hinblick auf die vorliegende Arbeit, einen differenzierten Blick auf die einzelnen Lymphozytenpopulationen zu werfen.

Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind über Wochen drastisch reduziert und zeigen eine verminderte Fähigkeit Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) freizusetzen (Forel et al. 2012). Wie die Monozyten/Makrophagen werden die NK-Zellen tolerant gegenüber

Endotoxin und anderen TLR-Agonisten (Souza-Fonseca-Guimaraes et al. 2012). Da den NK-Zellen eine zentrale Rolle bei der Virusbekämpfung zukommt, könnte deren Dysfunktion und Reduktion ein Grund für die bei Sepsis oft beschriebene Reaktivierung von latenten Virusinfektionen sein (Walton et al. 2014). Bis jetzt wurde dieser kausale Zusammenhang jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

Bis zu 50% aller B- und T-Zellen gehen in der akuten Phase der Sepsis in den programmierten Zelltod (Unsinger et al. 2009). Die T-Zellen gehen zugrunde unabhängig davon, ob sie CD4 oder CD8 exprimieren. Auch sind sowohl Gedächtniszellen als auch naive T-Zellen von der Apoptose betroffen (Unsinger et al. 2009, Unsinger et al. 2010). Hinzu kommt das Phänomen der „T cell exhaustion“ (Hotchkiss et al. 2013). Darunter versteht man die vermehrte Expression des Oberflächenmoleküles *programmed cell death protein-1* (PD-1), eine verminderte Zytokinfreisetzung, den Verlust der Proliferationsfähigkeit und den erleichterten Übergang in die Apoptose (Zajac et al. 1998). Der Vorgang der „T-cell exhaustion“ wird jedoch im Zuge einer Sepsis kontrovers diskutiert (Markwart et al. 2014). Die herausragende Bedeutung der T-Zellen bei Sepsis wird in einem späteren Abschnitt detaillierter erläutert.

Zusammengefasst hat Sepsis einen Einfluss auf fast alle Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Jede Subpopulation wird entweder in die Apoptose getrieben und/ oder erhöht ihre spezifischen antiinflammatorischen Effekte. Diese Fakten sprechen für das zurzeit verbreitete Sepsismodell, bei dem die Immunsuppression nach Sepsis dominierend ist und dadurch auch die Suszeptibilität für Sekundärinfektionen, Persistenz von Infektfoki und eines letalen Ausgangs erhöht ist. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche Charakteristika der Immunsuppression die erhöhte Sterblichkeit bedingen und wie lange diese andauert (Shankar-Hari et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese, dass die erhöhte Langzeitsterblichkeit mit einer latenten persistierenden Immunsuppression assoziiert ist, untersucht. In den Langzeitversuchen, die über die üblichen 28 Tage-Betrachtungen hinausgehen, wurden Mäuse bis zu 113 Tage nach Sepsisinduktion analysiert. Hinweise für eine länger währende Alteration des Immunsystems lieferte bereits eine kleine Studie von Arens et al. an 8 Langzeitüberlebende (9-52 Monate nach einer Sepsis) (Arens et al. 2016).

## 2.4 T-Zellen

Die durchgeführten Experimente befassen sich v.a. mit den T-Zell-Veränderungen im Zuge einer Sepsis. Dabei liegt der Fokus auf die Veränderungen der T-Zellen, die als eine Komponente für die andauernde Immunsuppression angesehen werden.

T-Zellen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, welche in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen gegliedert wird. Allen ist jedoch ein individueller T-Zell-Rezeptor (TZR) assoziiert mit CD3 gemein. Es wurden bis jetzt zwei verschiedene Arten des T-Zell-Rezeptors beschrieben. Ein TZR ist ein Heterodimer, bestehend entweder aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  oder einer  $\gamma$  und  $\delta$  Kette. Komplettiert wird der TZR durch CD3. Der TZR erkennt ein vom MHC-Komplex dargebotenes Antigen. Daraufhin erfolgt die Bindung eines Ko-Rezeptors. Im Falle der zytotoxischen T-Zellen ist dies CD8, welches an MHC I bindet. Dies wiederum wird von allen kernhaltigen Zellen gebildet und präsentiert zytoplasmatische Antigene an der Zelloberfläche, die im Proteasom prozessiert wurden. Die zweite große Subpopulation der T-Zellen exprimiert CD4, das wiederum mit MHC II interagiert. Dieses bietet den CD4<sup>+</sup>-Zellen Antigene von Pathogenen an, welche von sogenannten professionellen Antigenpräsentierenden Zellen prozessiert wurden. Dabei handelt es sich im Speziellen um B-Zellen, DZs oder Makrophagen/Monozyten.

Die zytotoxischen T-Zellen erkennen spezifisch über ihren TZR ein Peptid/MHC I Komplex. Diese Peptide sind bei infizierten Zellen meistens virale Antigene, können aber auch Peptidfragmente intrazellulärer Bakterien oder Protozoen sein. Auch entartete Tumorzellen präsentieren atypische Peptide und können von spezifischen zytotoxischen T-Zellen zerstört werden. Nach einer Peptid/MHC-TZR-Bindung werden Granula exozytiert, die Perforine und Granzyme beinhalten. Die erst Genannten durchlöchern die Zellmembran, durch die dann Granzyme ins Zytosol eindringen und dort Apoptose induzieren können. Der programmierte Zelltod kann auch mittels Fas-Liganden herbeigeführt werden.

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, auch bekannt als T-Helfer-Zellen, interagieren mit Antigen präsentierenden Zellen (APZ), welche den T-Zellen unter anderem Fremdanigene invadierender Pathogene mittels MHC II präsentieren. Abhängig von der Art des eliminierten Keimes und der APZ interagiert die T-Zelle mit unterschiedlichen Ko-stimulatorischen Signalen und wird von bestimmten Zytokinen beeinflusst. Diese drei

definierten Signale (Antigenerkennung, kostimulatorische Rezeptoren und Zytokine) führen zu unterschiedlichen Effekten und Differenzierungen der naiven T-Zelle.

Intrazelluläre Infektionen in Verbindung mit IL-12 und IFN $\gamma$  Stimuli induzieren eine T<sub>H</sub>1-Differenzierung. Dies geschieht in Gestalt einer klonaler Proliferation der naiven T-Zelle und deren massiver Zytokin-Freisetzung (IL-2, IFN $\gamma$ ). Dies wiederum aktiviert die Makrophagen, welche daraufhin die Pathogene effektiver abtöten können. Über den Umweg von spezifischen DZs, welche mit CD8<sup>+</sup>-Zellen interagieren, haben T<sub>H</sub>1-Zellen auch die Möglichkeit zytotoxische T-Zellen zu stimulieren und zu aktivieren. Außerdem können T<sub>H</sub>1-Zellen einen class switch in B-Zellen (IgG2a) induzieren.

T<sub>H</sub>2-Zell Differenzierung wird durch einen IL-4 Stimulus begünstigt. Diese T-Zellpopulation hilft beim Abtöten von extrazellulären Pathogenen, wie Helminthen und Protozoen. Dies erreichen sie mit der Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13. Auch T<sub>H</sub>2-Zellen können einen class switch in B-Zellen bewirken (IgG1 und IgE).

Eine weitere Gruppe der T-Helfer-Zellen sind die T<sub>H</sub>17-Zellen, welche nach dem von ihnen produzierten IL-17 benannt sind. Diese sind wichtig für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und somit essenziell bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen.

Einige naive CD4<sup>+</sup>-Zellen differenzieren sich in der Peripherie auch zu regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche immunsupprimierende Effekte vermitteln.

Nach Antigenerkennung proliferiert die naive T-Zelle und nimmt den charakteristischen Phänotyp einer Effektorzelle an. Sämtliche Nachkommen einer Mutterzelle weisen den gleichen klonalen TZR auf. Nach überstandener Infektion gehen viele dieser klonalen T-Zellen in Apoptose. Nur einige wenige differenzieren sich und können im Knochenmark als Central memory cells (CMs) oder im Gewebe als Effector memory cells (EMs) über Jahre persistieren. Diese stellen durch ihre beschleunigte und ausgeprägte Zytokinfreisetzung bei erneutem Kontakt mit dem Antigen ein effektives immunologisches Gedächtnis dar (Janeway CA Jr 2001).

Um effektiv sämtliche Pathogene bekämpfen zu können, muss eine ausreichende Diversität des T-Zell- Rezeptor Repertoires gewährleistet sein (Nikolich-Zugich et al. 2004). Die einzelnen individuellen TZRs unterscheiden sich vor allem in den complementarity-determining regions (CDRs). CDR3 ist dabei die variabelste Region des TZRs und tritt in Kontakt mit dem präsentierten Antigen. Dieses Areal besteht aus verschiedenen Segmenten (V-, J- Segmente für die  $\alpha$  Kette und V-, D-, J- Segmente für die  $\beta$  Kette). Für jedes Segment gibt es verschiedene Genloci, von



denen jeweils nur einer für den Rezeptor selektiert wird. Die verbliebenen Genloci werden deletiert. Die Variabilität wird realisiert durch die randomisierte Auswahl der Gene, der anschließenden Rekombination der verschiedenen Segmente und unterschiedlichen Kombinationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Zu den unterschiedlichen Rekombinationsmöglichkeiten kommen zusätzlich genomische Mutationen, welche an den Übergangsregionen zwischen den einzelnen Segmenten stattfinden. Wenn ein TZR einmal generiert ist, erfährt er, anders als bei den B-Zellen und deren Antikörpern, keine weiteren Modifikationen oder Mutationen und wird identisch an sämtliche Tochterzellen weitergegeben. Wenn man alle Möglichkeiten zusammennimmt, gibt es beim Menschen  $>10^{16}$  verschiedene TZRs-Kombinationsmöglichkeiten (Janeway CA Jr 2001).

Primitive lymphoide Stammzellen gelangen vom Knochenmark zum Thymus, wo sie zu T-Zellen heranreifen, sowie einen TZR und einen bestimmten Ko-Rezeptor entwickeln. Dafür unterliegen sie zunächst einer positiven Selektion, durch die alle Zellen in Apoptose gehen, die keine MHC-Moleküle erkennen. Anschließend erfahren Vorläuferzellen im Zuge der negativen Selektion den programmierten Zelltod, wenn diese zu stark an ein Selbst-Antigen binden. Nach den diversen Reifestadien im Thymus sind nun neue T-Zellen mit neuen TZRs entstanden, die im peripheren naiven Zell Pool integriert werden können. Somit stellt der Thymus die ultimative Quelle für die T-Zell-Diversität dar (Janeway CA Jr 2001).

Die frisch aus dem Thymus kommenden Zellen sind phänotypisch von den naiven T-Zellen in der Peripherie unterscheidbar. Sie haben auch den Beinamen „recent thymic emigrants“ (RTEs) (Fink 2013). Der Export neuer T-Zellen aus dem Thymus hat eine enorme Bedeutung für die Entstehung und für die Aufrechterhaltung eines diversen TZR- Repertoires, denn RTEs bringen neue Kombinationen von TZR in den peripheren Pool (den Braber et al. 2012).

Den Braber et al. beschreiben einen Unterschied der T-Zell-Homöostase zwischen Menschen und Mäusen. Bei Mäusen hat der Export aus dem Thymus eine große Bedeutung, während beim Menschen die Aufrechterhaltung des T-Zell-Pools v.a. peripher reguliert wird (den Braber et al. 2012). Bereits ab dem ersten Lebensjahr beginnt die Involution des Thymus beim Menschen. Nach der Pubertät besteht der Thymus vorwiegend aus Fettgewebe. Jedoch auch nach der morphologischen Veränderung des Thymus zirkulieren noch RTEs im Blut von adulten Menschen, was

für das Vorhandensein von noch intaktem Thymusgewebe spricht (Vrisekoop et al. 2008).

Die absolute Anzahl der T-Zellen bleibt größtenteils über das gesamte Leben konstant, reduziert sich physiologisch aber im hohen Alter (Sanson et al. 1993). Wenn es nun zu einer temporären Lymphopenie kommt, z.B. durch Chemotherapie, immunsuppressive Therapien oder gewisse Virusinfektionen, steigt die T-Zell-Zahl wieder auf ihren prä-lymphopenischen Wert an. Für diese Rekonstitution gibt es zwei mögliche Mechanismen: Zum einen können RTEs nun vermehrt in den übriggebliebenen naiven T-Zell-Pool integriert werden und eine höhere Diversität des TZR-Repertoires garantieren. Zum anderen proliferieren die verbliebenen naiven T-Zellen, was den Hauptmechanismus beim erwachsenen Menschen darstellt (Williams et al. 2007, Surh und Sprent 2008). Dieser Prozess wird homöostatische Proliferation (HP) genannt. Hierbei führt eine geringe Affinität des TZR zu einem Antigen zur Teilung der T-Zellen, wobei IL-7 ein essenzieller Bestandteil dieses Vorgangs ist (Tan et al. 2001). Im Zuge einer Lymphopenie wird auch das diverse TZR-Repertoire eingeschränkt, da nicht nur Zell-Klone zugrunde gehen, sondern oft naive T-Zellen mit ihren einzigartigen TZR. Wenn jedoch die Lymphopenie lediglich durch klonale Expansion der noch existierenden T-Zellen behoben wird, birgt dies die Gefahr einer eingeschränkten TZR Diversität bei normalisierter T-Zell-Zahl (Mackall et al. 1996). Ein weiteres Charakteristikum der homöostatischen Proliferation sind die phänotypischen Veränderungen der proliferierenden T-Zellen. Diese besitzen nun ähnliche Zelloberflächenmarker wie Gedächtnis-Zellen (Goldrath et al. 2000).

## 2.5 T-Zellen bei Sepsis

Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen übernehmen durch Ausschüttung von Zytokinen und Zell-Zell-Interaktionen eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr. Dabei verstärken und koordinieren sie die immunologischen Effekte des adaptiven und angeborenen Immunsystems.

Mehrere Studien zeigen, dass es zu einer Reaktivierung unterschiedlicher Viren der Herpesfamilie im Zuge einer Sepsis kommt (Walton et al. 2014). Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind essentiell bei der Kontrolle von latenten Herpesvirus-Infektionen (Ouwendijk et al. 2013).

Außerdem ist bekannt, dass eine erhöhte Suszeptibilität septischer PatientInnen besteht, an fungalen Infektionen zu erkranken (Otto et al. 2011). T<sub>H</sub>17-Zellen koordinieren, wie bereits beschrieben, die Abwehr gegen diverse Pilzinfektionen.

Zudem ist die „delayed-type hypersensitivity“ (DTH), ein Kriterium für ein funktionierendes T-Zell-Kompartiment, Jahre nach Sepsis noch immer beeinträchtigt (Christou et al. 1995).

Dieses Zusammenspiel zwischen T-Helferzellen und anderen Effektorzellen scheint demzufolge bei einem septischen Geschehen nachhaltig gestört. Zur Schlüsselrolle der T-Zellen während einer Sepsis wurden mehrere Reviews verfasst (Cabrera-Perez et al. 2014, Kasten et al. 2010b) und mehrere Studien belegen die Korrelation zwischen der Ausprägung der T-Zell-Apoptose und/oder Dysfunktionalität und dem tödlichen Ausgang einer Sepsis (Unsinger et al. 2012, Unsinger et al. 2010).

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass die Veränderung der T-Zellen bei Sepsis eine Hauptursache für die langfristige Immunsuppression ist und damit eine erhöhte Langzeitmortalität provoziert. In einem Review von Cabrera-Perez et al. unterscheidet der Autor drei CD4<sup>+</sup> T-Zell-spezifische Aspekte, die eine Immunsuppression bedingen (Cabrera-Perez et al. 2014).

Zum einen beschreibt er die T-Zell Dysfunktionen. Zum anderen erläutert er eine Erhöhung der Treg-Zahl. Als dritten Aspekt arbeitete der Autor die zurzeit publizierten Beiträge zur TZR-Diversitätseinschränkungen nach einer Sepsis heraus. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich unter anderem auf die zwei letztgenannten Problematiken. Es wurden hierzu zwei Publikationen verfasst. Ein wissenschaftlicher Artikel befasst sich mit regulatorischen, immunsupprimierenden Zellen und deren Einfluss auf die T-Zellen (Kulkarni et al. 2018). Die zweite Veröffentlichung untersucht die Auswirkungen einer Sepsis auf das TZR-Repertoire (Ammer-Herrmenau et al. 2019).

Da, wie oben bereits erwähnt, 50% der T-Zellen in Apoptose gehen, kann es zu einer Reduzierung der TZR-Repertoire Diversität kommen. Nach einigen Tagen ist jedoch die T-Zell-Anzahl wieder rekonstituiert. Unsinger et al. erforschten, dass die verbliebenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer homöostatischen Proliferation unterliegen, während die CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur unter IL-7 oder einem kognaten Antigen proliferieren konnten (Unsinger et al. 2009). Bislang ist noch keine endogene Quelle für die Erholung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Zahl bekannt. Diese Daten bezüglich der CD8<sup>+</sup>-Zellen wurden in weiteren Experimenten einer anderen Forschungsgruppe bestätigt (Condotta et al. 2013). Da außerdem eine Vielzahl der Thymozyten bei Mäusen und Menschen im Zuge einer Sepsis apoptotisch werden, spricht die aktuelle Datenlage für eine periphere Rekonstitution der T-Zellen. Dies wiederum würde bedeuten, dass

die TZR Diversität trotz Rekonstitution der T-Zell Anzahl potentiell eingeschränkt bliebe.

Seit einigen Jahren gibt es eine valide Methode, um die Diversität zu bestimmen. Durch das next generation sequencing (NGS) können die unterschiedlichen V-(D)-J-Kombinationen der  $\alpha$  und  $\beta$ -Kette analysiert werden. Zudem ist bei gleicher V-(D)-J-Kombination die Detektion verschiedener TZRs möglich, wenn sich diese durch genomische Mutationen an den Übergangsregionen der Segmente unterscheiden (Bolotin et al. 2012).

Diese hochvalide NGS-Methode wurde in den, der Arbeit zugrunde liegenden, Versuchen etabliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Damit kann das Ausmaß einer langanhaltenden Einschränkung der TZR-Repertoire Diversität (*Divpenie*) bei Sepsis beschrieben werden. Weiterhin wurden die in der Milz enthaltenen RTEs betrachtet, um die Rolle des Thymus bei der Rekonstitution der T-Zellen zu definieren. Um zu untersuchen ob das CD4<sup>+</sup> T-Zell-Kompartiment einen Monat nach Sepsis-Induktion trotz Wiederherstellung einer normalen T-Zell-Zahl noch immer Defizite aufweist, wurden die septischen Mäuse mit einem Aspergillus-Oberflächen-Antigen, gegen das auch Menschen eine T-Zell-Antwort entwickeln, konfrontiert (Bacher et al. 2014).

## 2.6 IL-7-Therapie bei Sepsis

Neben dieser Grundlagenforschung zur weiteren Klärung der T-Zell-Rekonstitution nach einer Sepsis wurde auch ein klinischer Aspekt in den Experimenten integriert. So wurde der langfristige Effekt von IL-7 auf die T-Zellen und das Überleben der Versuchstiere untersucht. IL-7 ist als immunmodulierendes Zytokin bereits Bestandteil muriner Forschung im septischen Setting (Unsinger et al. 2010, Venet et al. 2012, Unsinger et al. 2012). Es wurde weiterhin eine erste Studie veröffentlicht, bei der ein kleines Kollektiv septischer PatientInnen mit IL-7 behandelt wurden. Diese zeigte, dass die IL-7 Therapie von septischen Patienten gut vertragen wurde und sich deren Lymphozyten schneller und nachhaltig erholten (Francois et al. 2018).

Der Versuch immunmodulierend in ein septisches Geschehen einzugreifen ist ein eleganter Ansatz für eine generelle Therapie des heterogenen Krankheitsbildes. Bis jetzt sind jedoch größer angelegte Studien mit Immunsystem modulierende Therapien für Sepsis-PatientInnen ohne Erfolg geblieben (Hotchkiss et al. 2013). Bei diesen Studien lag der Fokus v.a. auf der Suppression der Hyperinflammation und der Inhibition von proinflammatorischen Zytokinen (Reinhart und Karzai 2001, Fisher

et al. 1994). Unter anderem sprechen sich Hotchkiss et al. für neue Therapiestrategien aus, welche das Immunsystem stärken und eine Immunsuppression verhindern. Dabei wurde besonders die Rolle von IL-7 hervorgehoben (Skrupky et al. 2011, Hotchkiss et al. 2013). Im Folgenden sollen die Hauptfunktionen des Zytokins kurz skizziert werden.

IL-7 ist für die Entwicklung der T-Zellen essenziell. Diese exprimieren in den meisten Differenzierungsstadien den IL-7-Rezeptor und sind permanent einem IL-7-Signal ausgesetzt. Dieses Interleukin wird somit als Überlebensfaktor für T-Zellen beschrieben (Lundstrom et al. 2012). Im Zuge einer Lymphopenie kommt es zur gesteigerten Produktion von IL-7, und der erhöhte Plasmaspiegel korreliert indirekt mit der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Zahl. Dadurch wird vor allem HP induziert (Tan et al. 2001, Goldrath et al. 2004). Es müssen hier jedoch auch nachteilige Aspekte erwähnt werden. Unter anderem steht IL-7 im Verdacht Autoimmunkrankheiten zu begünstigen (Deshpande et al. 2013).

Bei der Behandlung verschiedener humaner Krankheiten wurde IL-7 bereits getestet und zeigte einen nebenwirkungsarmen Therapieverlauf (Francois et al. 2018, Sportes et al. 2008). Bei HIV-PatientInnen ergab eine IL-7-Gabe einen positiven Effekt auf die Rekonstitution der T-Zellen und gute klinische Ergebnisse (Levy et al. 2009).

Viele Tierversuche bewiesen einen positiven Effekt einer IL-7-Therapie bei Sepsis (Unsinger et al. 2010, Unsinger et al. 2012, Shindo et al. 2017). Die Experimente zeigten eine Proliferation von naiven und Gedächtnis CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Weiterhin produzierten die T-Zellen der IL-7 behandelten Tiere mehr IFN $\gamma$  und exprimierten vermehrt anti-apoptotische Moleküle. Auch überlebten die behandelten Tiere länger, als die Unbehandelten. Es ist weiterhin das praxisrelevante 2nd Hit Modell hervorzuheben, bei dem die Tiere zunächst eine subletale Sepsis induziert bekommen und dann am 4. Tag nach Sepsisinduktion mit Candida intravenös oder einer Pseudomonas-Pneumonie konfrontiert wurden (Unsinger et al. 2012, Shindo et al. 2017). Die IL-7-Gabe erfolgte jedoch entweder gleich nach der Sepsisinduktion oder ein bis zwei Tage nach dem zweiten Hit mit Candida/ Pseudomonas. Dabei ist anzunehmen, dass IL-7 die T-Zellen vor der massiven Apoptose schützte und somit eine Immunsuppression verhinderte.

In den von uns durchgeführten Versuchen wurde die IL-7- Therapie erst am 5. Tag nach Sepsisinduktion begonnen. Da bereits am 3. Tag nach Sepsisbeginn eine ausgeprägte Lymphopenie verzeichnet wurde, ist an Tag 5 bereits von einem

Prozess der Rekonstitution auszugehen. D.h. die Mäuse befanden sich zum Zeitpunkt des Behandlungsstarts in der immunsuppressiven Phase. Da IL-7 v.a. die homöostatische Proliferation begünstigt, kann IL-7 möglicherweise das Problem der eingeschränkten TZR-Repertoire Diversität nicht lösen.

### 3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Rekonstitution von T-Zellen nach Sepsis zu charakterisieren und dabei die Auswirkungen einer IL-7 Therapie auf ebendiese zu evaluieren. Der Fokus lag dabei auf der T-Zell-Rezeptor- (TZR-) Diversität, der Auswirkung auf die recent thymic emigrants (RTEs), sowie der Funktionsfähigkeit der T-Zellen nach Sepsis. Weiterhin sollte die Rolle verschiedener regulatorischer Zellpopulationen während der, durch Sepsis bedingten, Immunsuppression näher definiert werden.

Übergeordnetes Ziel der Sepsisforschung ist die immer noch hohe akute sowie langfristige Mortalitätsrate zu erklären und neue Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen. Die Pathophysiologie der Sepsis ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Mit der Erforschung der T-Zell-Dynamik nach Sepsis will die vorliegende Arbeit zur Aufklärung der immunologischen Mechanismen beitragen.

Um die Rekonstitution der T-Zellen nach einer Sepsis genauer zu beschreiben, galt es folgende Fragen zu bearbeiten:

- Wie lange besteht die T-Zell Lymphopenie nach Sepsis und wie wird diese von IL-7 beeinflusst?
- Hat die IL-7 Therapie auch einen Effekt auf die Mortalität, wenn sie mit zeitlicher Latenz nach Sepsisbeginn appliziert wird?
- Erholen sich die T-Zellen durch homöostatische Proliferation und/ oder tragen die frisch aus dem Thymus immigrierten T-Zellen zur Normalisierung des peripheren T-Zellpools bei?
- Wie entwickelt sich die TZR-Diversität nach Sepsis und wird diese von IL-7 beeinflusst?
- Sind die T-Zellen trotz normaler Zell-Zahl in ihrer Funktion eingeschränkt?
- Welche regulatorischen Zelltypen sind an der Sepsis bedingten Immunsuppression beteiligt und wie beeinflussen sie die T-Zellen?

Enge Kooperation erfolgte mit der Humangenetik der Universitätsklinik Jena bezüglich der Sequenzierung der TZR-DNA und der bioinformatischen Auswertung der Proben. Bei letzterem bestand ebenfalls eine enge Zusammenarbeit mit der Immunologie der Medizinische Hochschule Hannover.

## **4 Publierte Originalarbeiten**

### **4.1 IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells**

AutorInnen: Upasana Kulkarni\*, Christoph Herrmenau\*, Stephanie J. Win, Michael Bauer, Thomas Kamradt

\* equal contribution

Erschienen: PLoS ONE 13(2): e0192304, am 21.2.2018



RESEARCH ARTICLE

# IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells

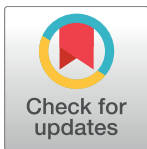
Upasana Kulkarni<sup>1☯</sup>, Christoph Herrmenau<sup>1☯</sup>, Stephanie J. Win<sup>1</sup>, Michael Bauer<sup>2,3</sup>, Thomas Kamradt<sup>1\*</sup>

**1** Institute of Immunology, Jena University Hospital, Jena, Germany, **2** Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Jena University Hospital, Jena, Germany, **3** Center for Sepsis Control & Care, Jena University Hospital, Jena, Germany

☯ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI, United States of America

\* [thomas.kamradt@med.uni-jena.de](mailto:thomas.kamradt@med.uni-jena.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Kulkarni U, Herrmenau C, Win SJ, Bauer M, Kamradt T (2018) IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. PLoS ONE 13(2): e0192304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304>

**Editor:** Ari Waisman, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, GERMANY

**Received:** November 13, 2017

**Accepted:** January 22, 2018

**Published:** February 21, 2018

**Copyright:** © 2018 Kulkarni et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from the German Ministry of Education and Science (BMBF; Center for Sepsis Control and Care to M.B. and T.K.) ([www.bmbf.de/](http://www.bmbf.de/); Grant Number: 01EO1502). C.H. is supported by the Studienstiftung des deutschen Volkes ([www.studienstiftung.de](http://www.studienstiftung.de)).

## Abstract

Immunological dysregulation in sepsis is associated with often lethal secondary infections. Loss of effector cells and an expansion of immunoregulatory cell populations both contribute to sepsis-induced immunosuppression. The extent and duration of this immunosuppression are unknown. Interleukin 7 (IL-7) is important for the maintenance of lymphocytes and can accelerate the reconstitution of effector lymphocytes in sepsis. How IL-7 influences immunosuppressive cell populations is unknown. We have used the mouse model of peritoneal contamination and infection (PCI) to investigate the expansion of immunoregulatory cells as long-term sequelae of sepsis with or without IL-7 treatment. We analysed the frequencies and numbers of regulatory T cells (Tregs), double negative T cells, IL-10 producing B cells and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) for 3.5 months after sepsis induction. Sepsis induced an increase in IL-10<sup>+</sup> B cells, which was enhanced and prolonged by IL-7 treatment. An increased frequency of MDSCs in the spleen was still detectable 3.5 months after sepsis induction and this was more pronounced in IL-7-treated mice. MDSCs from septic mice were more potent at suppressing T cell proliferation than MDSCs from control mice. Our data reveal that sepsis induces a long lasting increase in IL-10<sup>+</sup> B cells and MDSCs. Late-onset IL-7 treatment augments this increase, which should be relevant for clinical interventions.

## Introduction

Sepsis syndrome is a life-threatening organ dysfunction resulting from a dysregulated host response to an infection [1]. Immunological dysregulation is one of the major pathological events in sepsis [2–4]. Over-exuberant inflammatory responses and immunosuppression can occur simultaneously [4–6]. Treatment strategies for sepsis have improved, consequently more

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** DN, Double negative; IL-7, Interleukin 7; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; MDSCs, Myeloid derived suppressor cells; PCI, Peritoneal contamination and infection; Th, T-helper; Tregs, Regulatory T cells.

patients survive the acute sepsis episode [4,7]. These patients are burdened with significantly increased morbidity and mortality as long-term sequelae of sepsis [8–10] and mortality is further increased in sepsis survivors who had a secondary infection [11]. Currently neither the extent nor the duration of sepsis-induced immunosuppression is known. Furthermore, it has been impossible to rule out pre-existing immunodeficiency in sepsis patients. While the factors responsible for this increased morbidity and mortality are still unknown it is likely that long-term survival of sepsis patients depends on overcoming sepsis-induced immunosuppression. It is currently unknown if all sepsis survivors eventually recover from immunosuppression or if immune-recuperation proceeds with different kinetics and outcomes or selectively for particular cell populations in different subjects.

Considering the failure of various clinical trials aimed at targeting the hyper-inflammatory mediators, particularly cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  [3,4,12], it is necessary to analyse the long-term immune-perturbations in sepsis [13,14]. Moreover, immunological alterations in sepsis survivors are prognostically relevant [5,6]. Thus, it is necessary to perform basic and translational studies to understand post-sepsis immune-regulation. Immunoregulatory cells, including regulatory T cells (Tregs), IL-10 producing B cells, myeloid derived suppressor cells (MDSCs) and double negative (DN) T cells are important to dampen immune responses and to prevent autoimmunity and allergy [15–20]. In contrast, the role of these cells in the long-term sequelae of sepsis is unknown. To study the immunological sequelae of sepsis, we used the model of peritoneal contamination and infection (PCI) [21]. In this model, approximately 50% of the mice survive the acute phase of sepsis. Therefore, it is possible to determine the magnitude, duration and long-term consequences of sepsis-induced changes in the frequency and function of immunoregulatory cell populations in this model. We analysed Tregs, IL-10 producing B cells, MDSCs and double negative (DN) T cells 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction, replicating the post-acute, late and very late time points, respectively. IL-7 is required for lymphocyte development and maintenance [22] and sepsis induces ablation of IL-7-producing osteoblasts [23]. Early IL-7 treatment has been shown to be a promising approach in a mouse sepsis model [24] and *ex vivo* studies with IL-7-treated lymphocytes from sepsis patients showed significant improvement in their function [25]. To determine the effect of IL-7 treatment on the immunophenotype of sepsis-survivors we also analysed the effects of late-onset IL-7 treatment on the immunoregulatory cell populations.

## Methods

### Mice

C57BL/6 mice were bred and maintained at the animal facility of the University Hospital Jena. All animal experiments were approved by the appropriate governmental authority (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz; Registered Number 02–007/14) and conducted in accordance with institutional and state guidelines.

### Sepsis induction and IL-7 treatment

Sepsis induction in mice was performed as previously described [21]. Briefly, human stool samples were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Animals were randomly allocated to the sepsis or sham group. Sepsis was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 1.75 ml/kg body weight stool suspension, diluted (1:4) in saline. Sham mice received the equivalent volume of saline (i.p.). The septic mice received antibiotic treatment (meropenem 12 mg/kg, administered subcutaneously). The first antibiotic injection was performed 7 h post sepsis induction, after which it was given every 12 h for the next 3 days. Mice were monitored for symptoms including conjunctivitis, diarrhea, weakness and lack of movement. On average 50% of the mice died during

the acute phase of sepsis (days 1–5). Surviving mice were used for the analysis of long-term sequelae following sepsis. The experimental scheme is depicted in [S1A Fig](#).

From day 5–9 septic mice were either subcutaneously injected with PBS or recombinant human IL-7 (R&D Systems, 2.5 µg/mouse/day). Human IL-7 can bind and signal via the murine IL-7 receptor [26]. In order to stabilize the cytokine, IL-7 was mixed with a ten-fold higher concentration of an anti-human IL-7 antibody (clone M25; BioXCell) [27,28].

## Flow cytometry

After blockade of Fc receptors with anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2, in house production), single cell suspensions were incubated for 15 min with conjugated antibodies against cell surface markers. For intracellular cytokine staining of T and B cells, cells were first incubated in RPMI 1640 medium with PMA (50 ng/ml, final concentration), ionomycin (500 ng/ml, final concentration), LPS (10 µg/ml, final concentration), and monensin (2 mM, final concentration) for 5 h in 48-well flat-bottom plates. After 5 h culture, the surface markers were first stained followed by fixation and permeabilization using BD Cytofix/Cytoperm and intracellular staining. Samples were analysed using a LSRII (BD Biosciences). Data were analysed using FlowJo software (TreeStar Inc.).

## Antibodies

The following anti-mouse antibodies and conjugates were used in the flow cytometry experiments: *Alexa Fluor 647*: CD19 (clone 1D3; eBioscience); *Alexa Fluor 700*: GR-1 (RB6-8C5, eBioscience); *APC*: CD11b (clone M1/70; eBioscience); IL-10 (JES5-16E3, eBioscience); *APC-eFluor780*: CD4 (clone GK1.5; eBioscience), CD8 (53–6.7, eBioscience); *eFluor-450*: Foxp3 (FJK16s, eBioscience); *FITC*: CD5 (53–7.3, eBioscience); *Pacific Blue*: CD1d (1B1, Biolegend), CD3 (clone 145-2C11, in house production); *PE*: IFN-γ (XMG-1.2, eBioscience); *PECy5*: γδTCR (GL3, eBioscience); *PECy7*: CD25 (PC61.5, eBioscience), NK1.1 (clone PK136; eBioscience).

## MDSC-T Cell co-culture assay

CD4<sup>+</sup> T cells and Gr1<sup>+</sup> MDSCs were isolated from total spleen cells using biotin-labeled antibodies followed by automatic MACS (autoMACS Pro Separator, Miltenyi Biotec). The CD4<sup>+</sup> T cells were first labeled with eFluor 670-labeled cell proliferation dye (eBioscience) followed by co-incubation of 2 × 10<sup>5</sup> cells with Gr1<sup>+</sup> cells in the ratio 1:1 in 96 well round bottom plates. T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 (3 µg/ml) antibodies. Proliferation of CD4<sup>+</sup> cells was analysed 3 days later by flow cytometry.

## Statistics

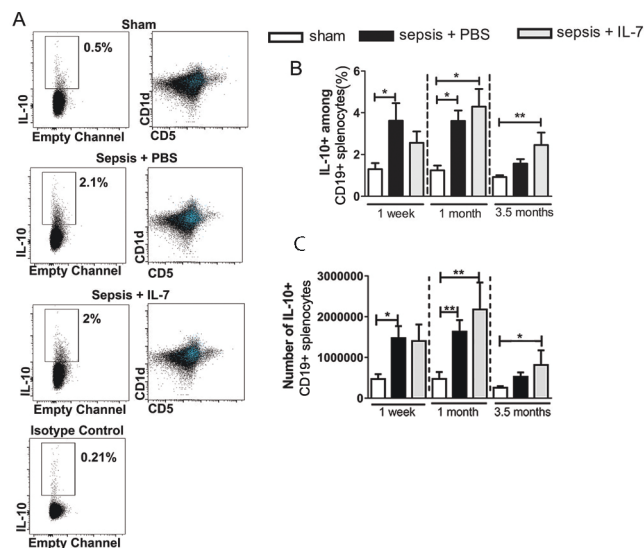
Statistical calculations were performed using GraphPad Prism. Experiments with two groups were analysed by unpaired two-sided Student's *t* test. Comparisons involving multiple groups were analysed in a two-stage procedure by one-way ANOVA. If the ANOVA indicated a significant difference between the groups ( $P < 0.05$ ), all groups were further compared pairwise by Tukey's multiple comparison test. In case of comparisons involving multiple groups with non-parametric data, a Kruskal-Wallis test was performed. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Data are expressed as mean ± SEM as indicated in the figure legends.

## Results

### Sepsis induces a sustained increase of IL-10<sup>+</sup> B cells

The aim of this study was to evaluate the numbers and frequencies of immunoregulatory cell populations for 3.5 months after sepsis induction in the presence or absence of early IL-7 treatment. As expected in the PCI model [21], the mortality within the first five days after sepsis induction was > 40%. On day five, mice were randomly allocated to the IL-7 treatment group, which were treated subcutaneously with 2.5 µg recombinant human IL-7 daily from day 5–9, or the control group, which received no further treatment. Mortality was similar in both groups throughout observation period of 3.5 months (S1B Fig).

To examine if increased numbers of IL-10 producing B cells are a long-term outcome of sepsis, we performed IL-10 staining in CD19<sup>+</sup> B cells from the spleens of septic and control mice (Fig 1A). IL-10 producing B cells have also been dubbed “regulatory B cells” (Bregs) and CD1d and CD5 are commonly used as surface markers for these IL-10 producing regulatory B cells [29]. Most of the IL-10<sup>+</sup> B cells were in the CD1d<sup>hi</sup>/CD5<sup>+</sup> population (Fig 1A). One week and one month after sepsis induction, both the percentage and the numbers of IL-10<sup>+</sup> cells among B cells were increased threefold in mice with sepsis compared with non-septic (sham) mice (Fig 1B and 1C). 3.5 months after sepsis, IL-10 expressing B cells were still slightly, but no longer significantly, increased in septic mice. Interestingly, 1 month post-sepsis both the frequency and the numbers of IL-10<sup>+</sup> B cells were higher in IL-7-treated septic mice than in sham mice and remained elevated even 3.5 months after sepsis induction (Fig 1B and 1C). IL-7 is essential for the development of B cells [30] and an increase in total B cells was also seen in the IL-7 treated mice, 1 month and 3.5 months after sepsis induction (S2 Fig). The results indicate that short-term treatment with IL-7 can result in long-term changes in the development of B cells including IL-10 expressing B cells.

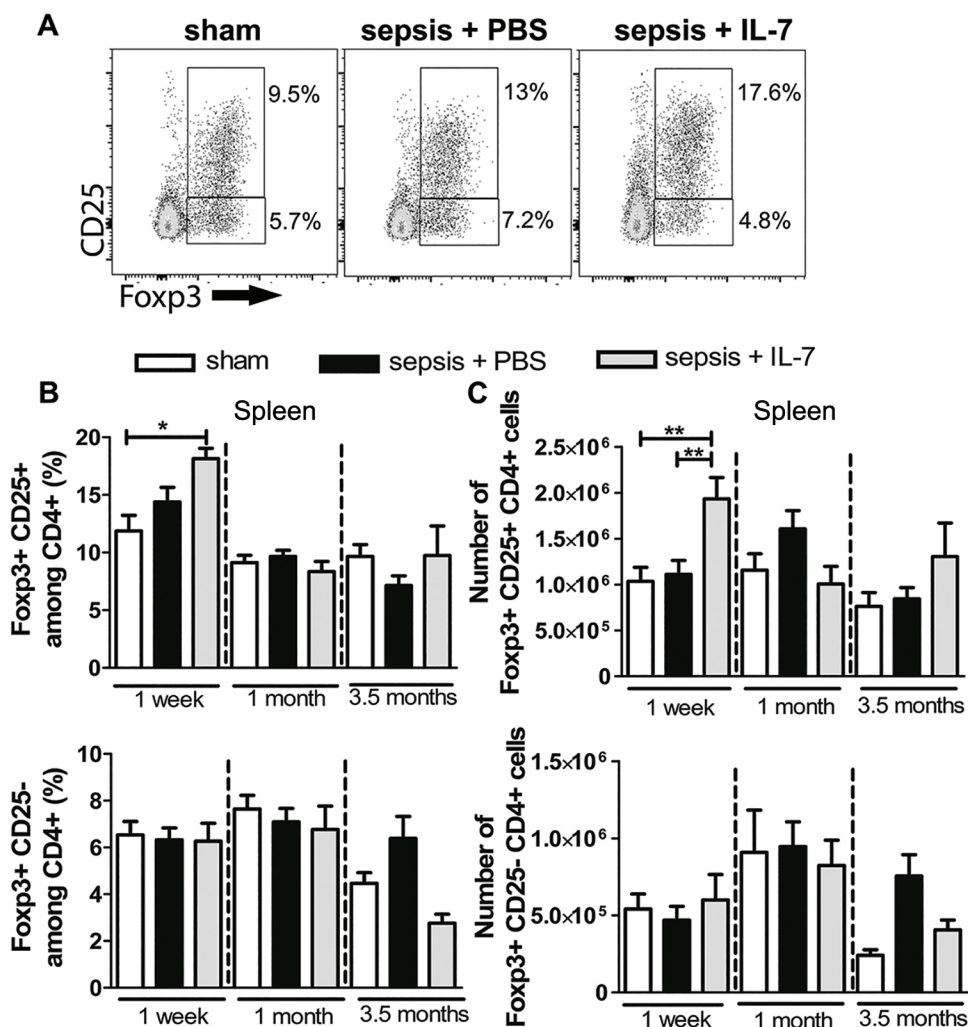


**Fig 1. Sepsis induces a sustained increase of IL-10<sup>+</sup> B cells.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. IL-10<sup>+</sup> and CD1d<sup>hi</sup> B cells from the spleen were analysed 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction. (A) Representative flow cytometry images from analyses 1 week after sepsis induction showing IL-10<sup>+</sup> cells among CD19<sup>+</sup> B cells (left panel) and distribution of IL-10<sup>+</sup> cells (blue) with respect to CD1d and CD5 markers (right panel). (B) Frequency of IL-10<sup>+</sup> cells among CD19<sup>+</sup> B cells. (C) Number of IL-10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> cells in the spleen. n (number of mice per group) = 6–10 (1 week), 9–16 (1 month), 7–16 (3.5 months). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 (ANOVA). Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of three experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304.g001>

## Sepsis does not induce a lasting expansion of Tregs

Increased Treg frequencies in early sepsis have been reported in clinical and experimental studies [2,14,31–34]. To determine if increased Treg numbers are maintained as a long-term consequence of sepsis, we analysed the frequency and numbers of Tregs in spleen from septic and control mice at different time points after sepsis induction. Two distinct populations of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were detectable: Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Fig 2A). Numbers and frequencies of both these populations were similar in the sepsis and control groups from 1 week until 3.5 months after sepsis induction. Interestingly, IL-7 treatment resulted in an immediate increase in the classical Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg population, 1 week after sepsis induction (Fig 2B and 2C). In contrast, no increase in total CD4<sup>+</sup> T cells was observed 1 week post



**Fig 2. Sepsis induces a transient expansion of Tregs.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. CD4<sup>+</sup> T cells from the spleen were analysed for expression of Foxp3 and CD25, 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction. (A) Representative flow cytometry images from analysis after 1 month showing CD25<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> T cells. (B) Frequency of Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (top) and Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (bottom) cells among CD4<sup>+</sup> T cells. (C) Number of Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells (top) and Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (bottom). n = 7–13 (1 week), 9–16 (1 month), 5–18 (3.5 months). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (ANOVA). Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of three experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304.g002>



sepsis induction in IL-7-treated septic mice (S3 Fig), indicating a preferential expansion of Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs upon IL-7 treatment. The increase in the Treg population following IL-7 treatment was only short-term and there were no significant differences in the frequency or numbers of Tregs between IL-7-treated mice and controls at 1 month and 3.5 months after sepsis induction (Fig 2B and 2C).

### Sepsis results in sustained activation of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells

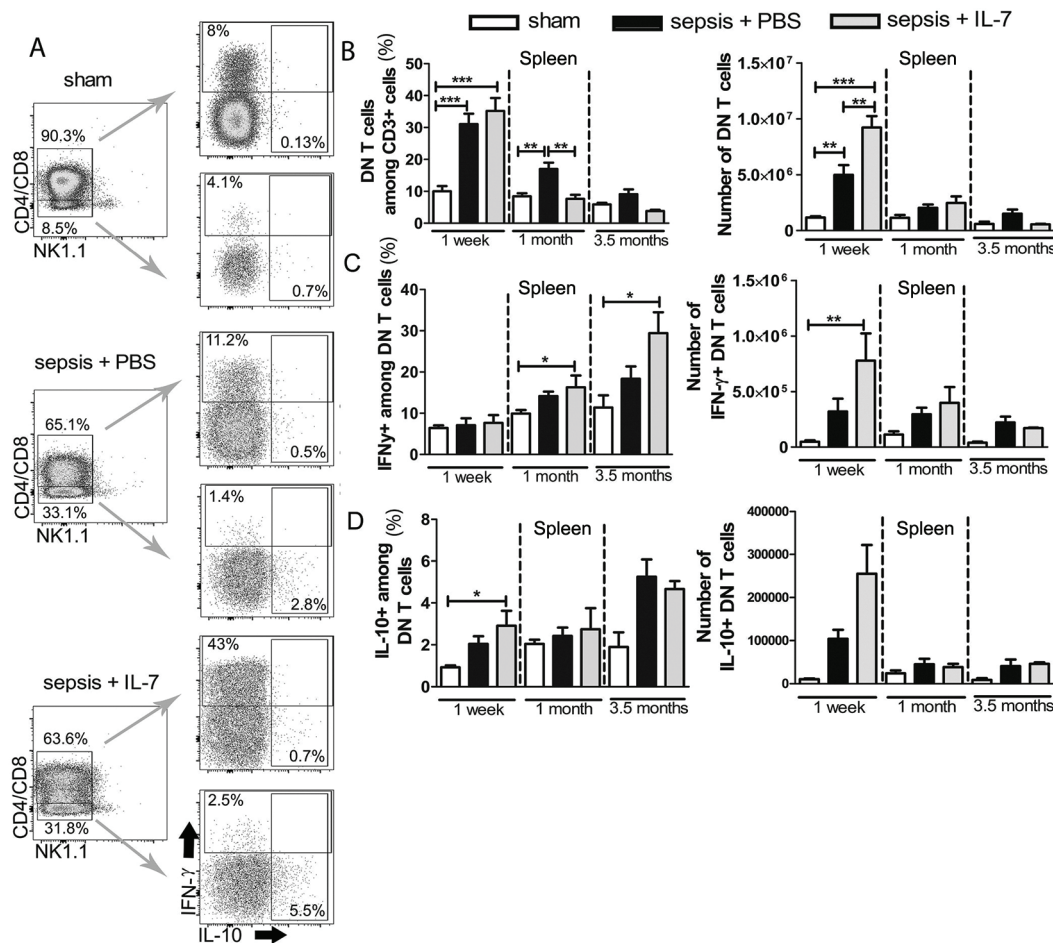
CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double negative T cells (DN T cells) that are neither NK T cells nor  $\gamma\delta$  T cells are believed to be T cells that escape negative selection in the thymus [20]. Some studies suggest that these cells play a pathogenic role by producing inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  [35]. Other studies reported these cells to be anti-inflammatory [36]. During flow cytometric analysis, we gated and analysed from spleen the CD3<sup>+</sup> T cells that did not express CD4, CD8,  $\gamma\delta$ TCR and NK1.1 as DN T cells (S4 Fig). The frequency and numbers of DN T cells in the spleen increased dramatically, more than threefold, 1 week after sepsis induction. This increase was even greater in IL-7-treated septic mice (Fig 3A and 3B). To examine the effector functions of the DN T cell population in septic and post-septic mice, we analysed their production of IFN- $\gamma$  and IL-10. One week after sepsis induction, the frequency of IFN- $\gamma$  producers among the DN T cells was similar in all three groups of mice (Fig 3C). Given the highly increased absolute numbers of DN T cells in the IL-7-treated septic mice, the number of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> DN T cells was significantly increased in these mice compared with sham mice (Fig 3C). The frequency of IFN- $\gamma$  producers among DN T cells continued to increase in septic mice, most prominently in the IL-7-treated septic mice throughout the observation period (Fig 3C). IL-7 treatment also increased the IL-10<sup>+</sup> DN T cells shortly after administration (Fig 3E). After sepsis, the frequency and numbers of IFN- $\gamma$ -expressing DN T cells consistently remained higher than IL-10<sup>+</sup> cells.

### Sepsis induces a massive and long-lasting increase in MDSCs that is augmented by IL-7 treatment

MDSCs are a heterogeneous group of immature myeloid cells, which dampen immune responses [17,37]. We stained spleen and bone marrow preparations for the classical markers of MDSCs: Gr1 and CD11b (Fig 4A and 4B). The frequency and numbers of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells were massively increased in the bone marrow and spleen of mice with sepsis, most prominently in the septic mice treated with IL-7, compared with sham mice (Fig 4C and 4D). The frequency and numbers of MDSCs in the spleen were already increased (approximately 10 fold) in both groups of septic mice 1 week after sepsis induction compared with control mice (Fig 4C and 4D). This increase was long-lasting and even at 3.5 months after sepsis induction, the frequency of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells was significantly increased in both groups of septic mice compared with controls. Remarkably, similar to our observations of DN T cells and IL-10 producing B cells, the sepsis-induced increase in this immunosuppressive cell population was further enhanced in IL-7-treated septic mice (Fig 4). The frequency of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells was also significantly increased in septic mice as well as IL-7-treated septic mice in bone marrow at all of the analysed time points. Interestingly, even at the very late time point of 3.5 months after sepsis induction, the frequency of the Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> population in the bone marrow of septic and IL-7-treated septic mice remained higher than the sham mice (Fig 4C and 4D).

### Increased suppressive capacity of MDSCs from septic mice

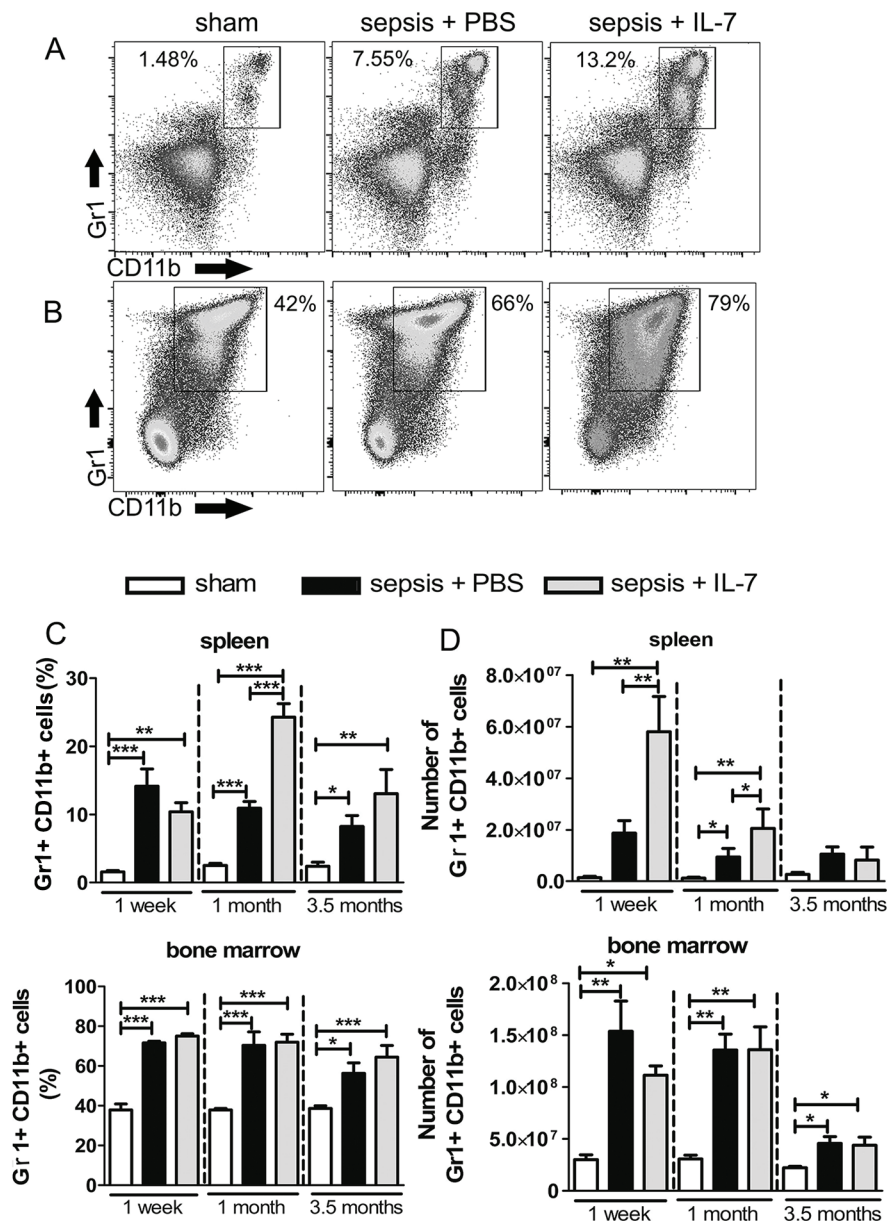
The phenotypic characterization of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells is a convenient starting point for identifying MDSCs, but their immunosuppressive capacity must also be demonstrated. Inhibition of



**Fig 3. Sepsis results in sustained activation of DN T cells.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. The cytokine expression in CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>γδTCR CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double negative, DN) T cells from the spleen was analysed 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction. (A) Representative flow cytometry images from analysis after 1 week showing DN T cells and IFN-γ and IL-10 expression. (B) Frequency of DN T cells among CD3<sup>+</sup> cells (left) and their absolute numbers (right). (C) Frequency of IFN-γ<sup>+</sup> cells among DN T cells (left) and their absolute numbers (right). (D) Frequency of IL-10<sup>+</sup> cells among DN T cells (left) and their absolute numbers (right). n = 7–13 (1 week), 5–10 (1 month), 3–6 (3.5 months) for IL-10 staining and 3–12 (3.5 months) for IFN-γ staining. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (ANOVA). Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of three experiments for the sham and sepsis + PBS groups. Data are representative of two experiments for the sepsis + IL-7 group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304.g003>

T-cell activation is currently considered the gold standard to identify Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells as MDSCs [37]. To determine if the Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells possess the immunosuppressive effector functions of MDSCs, we co-cultured Gr1<sup>+</sup> cells with CD4<sup>+</sup> T-helper (Th) cells and analysed T cell proliferation. In this assay, Gr1<sup>+</sup> cells from sham, septic or IL-7-treated septic mice were co-cultured with equal numbers of CD4<sup>+</sup> T cells for 3 days. To rule out any Th-cell intrinsic difference in susceptibility to MDSC-mediated suppression, we cultured MDSCs from spleens of sham, septic or IL-7-treated septic mice with splenic Th cells from all 3 different groups of mice (Fig 5B). Approximately 80% of CD4<sup>+</sup> T cells from all of the 3 groups proliferated in the presence of Gr1<sup>+</sup> cells from sham mice (Fig 5), similar to the proliferation observed in T cells cultured in the absence of Gr1<sup>+</sup> cells (S5 Fig). In contrast, the T cell proliferation was significantly reduced upon co-culture with Gr1<sup>+</sup> cells from untreated septic mice as well as IL-7-treated septic mice (Fig 5A and 5B). This finding confirmed that the Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells

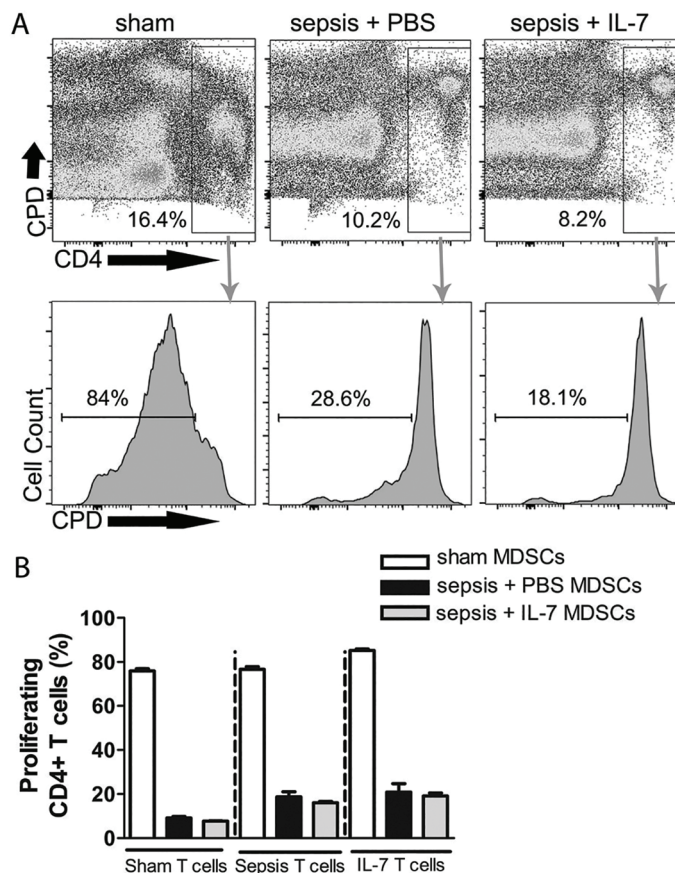


**Fig 4. Sepsis results in a sustained expansion of MDSCs.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells from the spleen and bone marrow were analysed 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction. (A, B) Representative flow cytometry images from spleen (A) and bone marrow (B) from analysis after 3.5 months. (C) Frequency of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells among total spleen cells (top) and among total bone marrow cells (bottom). (D) Number of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in spleen (top) and bone marrow (bottom). n = 6–9 (1 week), 5–12 (1 month), 8–20 (3.5 months). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 (ANOVA). Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of three experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304.g004>

observed in septic mice are indeed immunosuppressive MDSCs. Interestingly, the T cells from IL-7-treated septic mice were slightly, if not significantly, more resistant to the effect of MDSCs compared with non-septic sham mice (Fig 5B).





**Fig 5. MDSCs from septic mice efficiently suppress T cell proliferation.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. The proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of Gr1<sup>+</sup> cells from spleen was analysed 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction. (A) Representative flow cytometry images from analysis after 1 month showing proliferation of T cells (determined by dilution of cell proliferation dye, CPD) from septic mice treated with IL-7 when cultured with MDSCs from sham mice (left), sepsis + PBS mice (middle) and sepsis + IL-7 mice (right). (B) Graph representing frequency of proliferating CD4<sup>+</sup> T cells from spleen when cultured with MDSCs from spleen from different groups of mice for 3 days. This graph is representative of the experiment performed 1 month post-sepsis induction. n = 3–4 (for all time points). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (ANOVA). Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of one of three experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304.g005>

## Discussion

Immunoregulatory cells have been shown in various infection models to cause immunosuppression and failure to control the infection [38–41]. This study has demonstrated massive and long-lasting expansions of IL-10-producing B cells and MDSCs in septic mice; a transient increase in number and activation of DN T cells and a very brief increase in Tregs. Three main conclusions emerge from this study. First, there is no *restitutio ad integrum* in the immune system in mice having survived acute sepsis. Secondly, our experimental study, in which we used wild-type animals, rules out a pre-existing immunodeficiency and affirms that long-lasting immunological alterations are a consequence of sepsis. In our experimental setting (*specific pathogen free* mice) secondary infections did not occur, which is clearly different from the clinical situation. It is outside the scope of this experimental study to evaluate possible clinical consequences of the prolonged expansion of immunoregulatory cells. Thirdly, the administration of IL-7 at a relatively late time point (days 5–9 post sepsis induction) did not have the same

beneficial effect as previously described with earlier initiation of IL-7 treatment (starting 90 minutes after cecal ligation and puncture [24]). Instead late IL-7 treatment further increased and prolonged the expansion of immunoregulatory cell populations. Given the well-documented critical function of IL-7 for lymphocyte homeostasis, our findings do not indicate any sepsis-specific effect of IL-7 but rather reflect the physiological functions of IL-7 which also occur in the setting of sepsis (22).

IL-10-expressing B cells have been implicated in various diseases, including infections [38,39]. These cells have not been studied in sepsis. In our study, we examined B-cells for their ability to express the immunosuppressive cytokine, IL-10. Additionally, we analyzed these cells for the expression of previously defined murine phenotypic markers for so-called Bregs (CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>). We show, for the first time, significantly increased frequency and numbers of IL-10 expressing B cells in septic mice. Interestingly, the expanded IL-10<sup>+</sup> B cell population remained for almost one month after sepsis induction and is, thus, likely to contribute to long-term post-sepsis immunosuppression. Moreover, IL-10<sup>+</sup> B cell frequency and numbers were further increased by IL-7 treatment. Whether these cells protect against sepsis-associated hyperinflammation and/or contribute to immunosuppression causing further susceptibility to secondary infections is a topic of further investigation.

Clinical studies have revealed an increased frequency of Tregs within the diminished T cell population during the first few days after sepsis diagnosis. These findings indicate a preferential survival of Tregs compared with effector T cells in early sepsis [14,33,42]. Experimental studies in preclinical models also revealed an early, transient increase in Treg frequency [14,42]. To date, it is not clear whether an increased frequency of Tregs in early sepsis is beneficial, due to their capacity to dampen hyper-inflammatory responses; detrimental, by contributing to an increased susceptibility for secondary infections; or inconsequential. The available experimental data are contradictory: Treg depletion has been reported to improve, worsen or to be inconsequential for sepsis-outcome [14,31,42]. Although Treg frequency and numbers have been studied extensively in human and experimental sepsis, there is a lack of knowledge on Tregs in sepsis-survivors. We report that there are no significant differences in Treg frequency or numbers between septic and control mice between 1 week and 3.5 months after sepsis. Interestingly, however, 1 week post sepsis, both the relative frequency and the absolute number of Tregs were significantly higher in IL-7-treated septic mice than in untreated septic mice or control mice, indicating a preferential survival of Tregs over effector T cells upon IL-7 administration. This finding confirms and extends earlier reports on IL-7-dependent survival of Tregs [43] and is, therefore, easily compatible with earlier reports on increased Treg frequency in early sepsis [14,33,42].

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>−</sup> T cells with  $\alpha\beta$ TCR (DN T cells) are thought to arise after escaping negative selection in the thymus and proliferating in the periphery [20]. We report here for the first time, the increased presence of DN T cells in sepsis, particularly 1 week post sepsis. The high frequency of DN T cells even in non-treated septic mice indicates that the increase in this cell population was not primarily due to IL-7-related T cell survival and proliferation [44].

Protective as well as pathogenic effector functions have been ascribed to MDSC in sepsis [4]. We observed an expansion of MDSCs for as long as 3.5 months after sepsis induction. This confirms and extends an earlier report on lasting MDSCs expansion after sepsis [45]. Moreover, here we show for the first time, the induction of MDSCs upon IL-7 treatment, which led to an even greater increase in these cells, especially in the spleen. Whether IL-7 directly supports the development of Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells or whether it has an indirect effect via T cells, needs to be further investigated. The role of MDSCs in sepsis remains enigmatic. Whereas a preclinical study found that adoptive transfer of MDSCs reduced mortality in a mouse model of sepsis [46], a recent clinical study reported that an increase in MDSCs beyond

the acute phase of sepsis, up to day 28, was associated with increased nosocomial infections [47]. Importantly, the MDSCs from septic mice were much more potent inhibitors of T-cell proliferation than the MDSCs from healthy controls. Given that MDSCs from non-treated and IL-7-treated septic mice strongly inhibited T-cell proliferation, the sustained presence of large numbers of these cells for months after sepsis strongly suggests that the MDSCs contribute to the lasting immunosuppression in sepsis survivors. The relative contribution of MDSC or the other immunoregulatory cell types investigated here, alone or in combination, to the immunosuppression observed in sepsis patients remains to be investigated.

## Conclusion

Our study sheds light on the expansion and function of immunosuppressive cells for up to 3.5 months after sepsis. Such a detailed long-term follow up study to analyse all the regulatory cell types has not been performed in mouse sepsis models or human sepsis patients to date. The increased and persistent presence of these cells and their immunosuppressive capacity in the PCI sepsis mouse model suggests that analysing these cells in sepsis patients and survivors is also relevant. Moreover, the fact that the frequencies of all of the investigated immunosuppressive cell populations, particularly the IL-10 producing B cells and MDSCs, were further increased by late IL-7 treatment should be considered for clinical studies.

## Supporting information

**S1 Fig. Survival of mice following sepsis induction and IL-7 treatment.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. Mice were checked for survival every day. (A) Experimental setup scheme. (B) Graph representing percentage survival of mice over the entire period of observation.  
(TIF)

**S2 Fig. B cell population long-term post sepsis.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. CD19<sup>+</sup> from the spleen were analyzed 1 month and 3.5 months later. (A) Representative flow cytometry plots from 1 month post sepsis induction. (B) Graphs showing number of B cells in spleen 1 month and 3.5 months post sepsis induction.  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (ANOVA). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data are representative of two experiments.  
(TIF)

**S3 Fig. IL-7 treatment does not increase CD4<sup>+</sup> cell numbers.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction. IL-7 (Sepsis + IL-7) or PBS (Sepsis + PBS) was injected daily for 5 days from day 5–9 post sepsis induction. The graph represents the absolute numbers of CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen, 1 week, 1 month and 3.5 months following sepsis induction. (A) Representative flow cytometry plots from 1 week post sepsis induction. (B) Graphs showing number of CD4<sup>+</sup> T cells in spleen 1 week, 1 month and 3.5 months post sepsis induction.  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  (ANOVA). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data are representative of two experiments.  
(TIF)

**S4 Fig. Schematic showing analysis of DN T cells using flow cytometry.**  
(TIF)

**S5 Fig. Controls in MDSC assay.** (A) Representative flow cytometry images showing CD4<sup>+</sup> T cell proliferation when T cells were cultured without any stimulation (negative control) and when T cells were stimulated alone without addition of Gr1<sup>+</sup> cells (positive control). (B) Graph representing the same. (TIF)

## Acknowledgments

The authors wish to thank D. Himsel, A. Krause, F. Rost and B. Schikowski for expert technical assistance.

This study was supported by grants from the German Ministry of Education and Science (BMBF, Center for Sepsis Control and Care to MB and TK). CH is supported by the Studienstiftung des deutschen Volkes.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Michael Bauer, Thomas Kamradt.

**Funding acquisition:** Thomas Kamradt.

**Investigation:** Upasana Kulkarni, Christoph Herrmenau, Stephanie J. Win.

**Supervision:** Michael Bauer, Thomas Kamradt.

**Writing – original draft:** Upasana Kulkarni, Christoph Herrmenau.

**Writing – review & editing:** Michael Bauer, Thomas Kamradt.

## References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903338
2. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013) Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13: 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552> PMID: 24232462
3. Deutschman CS, Tracey KJ (2014) Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 40: 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001> PMID: 24745331
4. Delano MJ, Ward PA (2016) The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274: 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499> PMID: 27782333
5. Scicluna BP, Klein Klouwenberg PM, van Vught LA, Wiewel MA, Ong DS, Zwinderman AH, et al. (2015) A molecular biomarker to diagnose community-acquired pneumonia on intensive care unit admission. *Am J Respir Crit Care Med* 192: 826–835. <https://doi.org/10.1164/rccm.201502-0355OC> PMID: 26121490
6. Bauer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kortgen A, Moller E, Felsmann K, Cavaillon JM, et al. (2016) A Transcriptomic Biomarker to Quantify Systemic Inflammation in Sepsis—A Prospective Multicenter Phase II Diagnostic Study. *EBioMedicine* 6: 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.006> PMID: 27211554
7. Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. (2015) Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med* 43: 3–12. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000723> PMID: 25275252
8. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE (2010) Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med* 38: 1276–1283. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d> PMID: 20308885
9. Cuthbertson BH, Elders A, Hall S, Taylor J, MacLennan G, Mackirdy F, et al. (2013) Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. *Crit Care* 17: R70. <https://doi.org/10.1186/cc12616> PMID: 23587132

10. Prescott HC, Langa KM, Liu V, Escobar GJ, Iwashyna TJ (2014) Increased 1-year healthcare use in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 62–69. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0471OC> PMID: 24872085
11. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Frencken JF, Scicluna BP, Klein Klouwenberg PM, et al. (2017) The Host Response in Sepsis Patients Developing Intensive Care Unit-acquired Secondary Infections. *Am J Respir Crit Care Med*.
12. Fisher CJ Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. (1996) Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334: 1697–1702. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342603> PMID: 8637514
13. Cohen J, Opal S, Calandra T (2012) Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis* 12: 503–505. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70136-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70136-6) PMID: 22742624
14. Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Gandia F, Gomez-Herreras JI, Gomez-Sanchez E, et al. (2016) Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *J Infect* 72: 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.01.010> PMID: 26850357
15. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30: 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623> PMID: 22224781
16. Rosser EC, Mauri C (2015) Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42: 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005> PMID: 25902480
17. Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506> PMID: 19197294
18. Kamradt T, Mitchison NA (2001) Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344: 655–664. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103013440907> PMID: 11228281
19. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI (2016) The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* 37: 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004> PMID: 26858199
20. D'Acquisto F, Crompton T (2011) CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 82: 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.019> PMID: 21640713
21. Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, et al. (2011) Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res* 170: e123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.019> PMID: 21737102
22. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11: 330–342. <https://doi.org/10.1038/nri2970> PMID: 21508983
23. Terashima A, Okamoto K, Nakashima T, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H (2016) Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity* 44: 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.012> PMID: 27317262
24. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, et al. (2010) IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* 184: 3768–3779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903151> PMID: 20200277
25. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* 189: 5073–5081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202062> PMID: 23053510
26. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. (1989) Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 302–306. PMID: 2643102
27. Martin CE, van Leeuwen EM, Im SJ, Roopenian DC, Sung YC, Surh CD (2013) IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood* 121: 4484–4492. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449215> PMID: 23610371
28. Boyman O, Ramsey C, Kim DM, Sprent J, Surh CD (2008) IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J Immunol* 180: 7265–7275. PMID: 18490726
29. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF (2008) A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28: 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017> PMID: 18482568
30. Herzog S, Reth M, Jumaa H (2009) Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 9: 195–205. <https://doi.org/10.1038/nri2491> PMID: 19240758



31. Kuhlhorn F, Rath M, Schmoeckel K, Cziupka K, Nguyen HH, Hildebrandt P, et al. (2013) Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS One* 8: e65109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065109> PMID: [23724126](#)
32. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, O'Malley KA, Efron PA, McAuliffe PF, et al. (2006) Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 177: 7943–7949. PMID: [17114466](#)
33. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. (2004) Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32: 2329–2331. PMID: [15640650](#)
34. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. (2003) Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 31: 2068–2071. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000069345.78884.0F> PMID: [12847405](#)
35. Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T (1992) Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* 149: 1211–1215. PMID: [1386860](#)
36. Zhang ZX, Young K, Zhang L (2001) CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med (Berl)* 79: 419–427.
37. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7: 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150> PMID: [27381735](#)
38. Kulkarni U, Karsten CM, Kohler T, Hammerschmidt S, Bommert K, Tiburzy B, et al. (2016) IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration. *J Allergy Clin Immunol* 137: 1487–1497 e1486. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.018> PMID: [26653800](#)
39. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, et al. (2010) Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33: 777–790. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.016> PMID: [21093317](#)
40. Tebartz C, Horst SA, Sparwasser T, Huehn J, Beineke A, Peters G, et al. (2015) A major role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 194: 1100–1111. <https://doi.org/10.1049/jimmunol.1400196> PMID: [25548227](#)
41. El Daker S, Sacchi A, Tempestilli M, Carducci C, Goletti D, Vanini V, et al. (2015) Granulocytic myeloid derived suppressor cells expansion during active pulmonary tuberculosis is associated with high nitric oxide plasma level. *PLoS One* 10: e0123772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123772> PMID: [25879532](#)
42. Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W, Steinmann J, Vidigal PG, Hutzler M, et al. (2015) Relevance of Foxp3(+) regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* 146: 144–156. <https://doi.org/10.1111/imm.12490> PMID: [26059660](#)
43. Kim GY, Ligons DL, Hong C, Luckey MA, Keller HR, Tai X, et al. (2012) An in vivo IL-7 requirement for peripheral Foxp3+ regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 188: 5859–5866. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102328> PMID: [22593613](#)
44. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. (2001) IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8732–8737. <https://doi.org/10.1073/pnas.161126098> PMID: [11447288](#)
45. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. (2007) MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204: 1463–1474. <https://doi.org/10.1084/jem.20062602> PMID: [17548519](#)
46. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Muller M, et al. (2010) Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 207: 1453–1464. <https://doi.org/10.1084/jem.20091474> PMID: [20530204](#)
47. Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, Vanzant EL, Szpila BE, Mohr AM, et al. (2016) Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann Surg*.

#### 4.2 Sepsis induces long-lasting impairments in T helper cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations

AutorInnen: Christoph Ammer-Herrmenau, Upasana Kulkarni, Nico Andreas, Martin Ungelenk, Sarina Ravens, Angela Kather, Christian Hübner, Ingo Kurth, Michael Bauer, Thomas Kamradt

Erschienen: PLoS One. 14(2): e0211716, am 07.2.2019

RESEARCH ARTICLE

# Sepsis induces long-lasting impairments in CD4<sup>+</sup> T-cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations

Christoph Ammer-Herrmenau<sup>1</sup>, Upasana Kulkarni<sup>1‡</sup>, Nico Andreas<sup>1</sup>, Martin Ungelenk<sup>2</sup>, Sarina Ravens<sup>3</sup>, Christian Hübner<sup>2</sup>, Angela Kather<sup>1</sup>, Ingo Kurth<sup>2,4</sup>, Michael Bauer<sup>5,6</sup>, Thomas Kamradt<sup>1\*</sup>

**1** Institute of Immunology, Jena University Hospital, Jena, Germany, United States of America, **2** Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany, **3** Institute of Immunology, Hannover Medical School, Hannover, Germany, **4** Institute of Human Genetics, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, **5** Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Jena University Hospital, Jena, Germany, **6** Center for Sepsis Control & Care, Jena University Hospital, Jena, Germany

‡ Current address: Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI

\* [thomas.kamradt@med.uni-jena.de](mailto:thomas.kamradt@med.uni-jena.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Ammer-Herrmenau C, Kulkarni U, Andreas N, Ungelenk M, Ravens S, Hübner C, et al. (2019) Sepsis induces long-lasting impairments in CD4<sup>+</sup> T-cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations. PLoS ONE 14(2): e0211716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716>

**Editor:** Francesco Ria, Università Cattolica del Sacro Cuore, ITALY

**Received:** August 24, 2018

**Accepted:** January 18, 2019

**Published:** February 7, 2019

**Copyright:** © 2019 Ammer-Herrmenau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Sequencing data (fastq data and R-script products) are available on the ArrayExpress database under the accession number E-MTAB-7483. All other relevant data is within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from the German Ministry of Education and Science (BMBF; Center for Sepsis Control and Care to M.B.

## Abstract

Massive apoptosis of lymphocytes is a hallmark of sepsis. The resulting immunosuppression is associated with secondary infections, which are often lethal. Moreover, sepsis-survivors are burdened with increased morbidity and mortality for several years after the sepsis episode. The duration and clinical consequences of sepsis induced-immunosuppression are currently unknown. We have used the mouse model of peritoneal contamination and infection (PCI) to investigate the quantitative and qualitative recovery of T lymphocytes for 3.5 months after sepsis with or without IL-7 treatment. Thymic output and the numbers of naive and effector/memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes quickly recovered after sepsis. IL-7 treatment resulted in an accelerated recovery of CD8<sup>+</sup> lymphocytes. Next generation sequencing revealed no significant narrowing of the T cell receptor repertoire 3.5 months after sepsis. In contrast, detailed functional analyses of T helper (Th)-cell responses towards a fungal antigen revealed a significant loss of Th cells. Whereas cytokine production was not impaired at the single cell level, the absolute number of Th cells specific for the fungal antigen was reduced. Our data indicate a clinically relevant loss of pathogen-specific T cell clones after sepsis. Given the small number of naive T lymphocytes specific for a given antigen, this decrement of T cell clones remains undetected even by sensitive methods such as deep sequencing. Taken together, our data are compatible with long lasting impairments in CD4<sup>+</sup> T-cell responses after sepsis despite rapid recovery of T lymphocyte populations.

## Introduction

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [1]. Epidemiological studies suggest that more than 30 million cases of sepsis occur annually world-wide [2]. In the U.S., sepsis is the most expensive disease treated in



and T.K.). C.H. is supported by the Studienstiftung des deutschen Volkes.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CDR, complementarity-determining region; d, day; GFP, green fluorescent protein; GliT, gliotoxin sulfhydryl oxidase; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; HT sequencing, High-throughput sequencing; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; IL-7, Interleukin 7; IMGT, IMMUNOGENETICS; i.p., intraperitonea; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; PCI, Peritoneal contamination and infection; RTE, Recent thymic emigrants; s.c., subcutaneous; TCR, T-cell receptor; Th, T helper; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; Treg, Regulatory T cells.

hospitals with estimated hospital costs of > 20 billion US \$ annually [3]. Mortality rates have been declining in high-income countries due to improved treatment and range from 20–50% depending on disease severity and other factors [4,5]. Immunologically, sepsis is characterised by concurrent proinflammatory and immunosuppressive alterations [6–10]. A prominent feature contributing to immunosuppression in sepsis is an early massive loss of lymphocytes due to apoptosis [8–12], which is recapitulated in mouse models of sepsis [8–10,13]. Profound or persistent lymphopenia in sepsis patients is associated with increased mortality [14,15]. Another important mechanism of sepsis-induced immune-suppression is the expansion of immunosuppressive cell populations including regulatory T lymphocytes, IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [8–10,16]. We have recently shown that numbers of IL-10 producing B lymphocytes and MDSC remain increased for months after sepsis [16]. Sepsis-induced immune-suppression renders patients susceptible to secondary opportunistic infections [17,18] and reactivation of latent viral infections [19], both of which contribute to late sepsis mortality [4,5,20]. It is currently unclear how long the sepsis-induced immunosuppression lasts and if an immunological *restitutio ad integrum* is reached in sepsis survivors. Most clinical and experimental studies to date have focussed on the immunopathology of acute sepsis. Clinical and epidemiological data indicate a massively increased morbidity and mortality of sepsis survivors for years after discharge from the hospital [4,21–23] and it is currently unknown how much persistent immunological alterations contribute to this disease burden. Boosting the immune response in sepsis patients is a promising approach to improve survival [4,9,10]. One candidate approach is the cytokine Interleukin (IL)-7, which is important for T-cell survival [24]. Early IL-7 treatment has been shown to improve survival in murine sepsis models [25,26] and to restore normal lymphocyte counts and functions in septic patients [27,28]. On the other hand, late IL-7 treatment prolongs the sepsis induced expansion of immunosuppressive IL-10 producing B-lymphocytes and MDSC after sepsis [16].

We therefore studied the long-term recovery of different T cell subsets after sepsis with or without IL-7 treatment in the model of peritoneal contamination and infection (PCI) [16,29]. We analyzed the recovery of naive and effector/memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets and analyzed thymic output and T-cell receptor (TCR)-repertoire diversity 1 week, 1 month and 3.5 months after sepsis induction, representing the post-acute, late and very late time points, respectively. At 30 days after sepsis we also immunised mice with a fungal antigen and analyzed the T-cell response quantitatively and qualitatively.

## Materials and methods

### Mice

C57BL/6 mice and B6.Rag2-GFP mice [30] were bred and maintained at the animal facility of the University Hospital Jena. At the end of the experiments mice were killed by cervical dislocation under CO<sub>2</sub> anaesthesia. All animal experiments were approved by the appropriate governmental authority (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz; Bad Langensalza, Germany; registration number 02–007/14) and conducted in accordance with institutional and state guidelines. Efforts to alleviate suffering included regular inspection of the mice and the definition of humane endpoints according to institutional and state guidelines.

### Sepsis-induction and treatment

Sepsis was induced in mice by peritoneal contamination and infection (PCI) as described previously [16,29]. Briefly, human stool samples from three healthy non-vegetarian donors were collected, prepared and stored at -80°C. Composition and number of CFUs for the different

pertinent strains after storage were determined by microbiologic analysis as described in detail in [29]. Animals were randomly allocated to the sepsis or sham group. Sepsis was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 1.75 ml/kg body weight stool suspension, diluted (1:4) in saline. Control mice received the same volume of saline i.p. (sham group). Beginning at 7 hours after sepsis induction, the infected mice were treated with meropenem (12 mg/kg, subcutaneous (s.c.) twice daily for 3 days. They were evaluated for conjunctivitis, diarrhea, weakness and lack of movement. As expected [29], approximately 40–50% of the mice died within the acute phase (d1–5 post sepsis-induction) [16]. The following endpoints were defined and approved by the relevant authorities (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz; Bad Langensalza, Germany registration number 02–007/14): Lack of movement (even after touching), ascites, minimal signs of respiratory distress, severe conjunctivitis, severe diarrhea, cutaneous abscess (injection abscess). Once a mouse reached one of the defined endpoints it was immediately euthanized. No animals died before meeting criteria for euthanasia. Animal health and behavior was monitored at day of sepsis induction every 4 hours, the following 2 days every 6 hours and at all other days at least once a day. All people handling mice have had special training, either as professional animal care takers or—upon successful completion of a mandatory training course—a certification approved by the appropriate governmental authority (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz; Bad Langensalza, Germany) registration number 02–007/14). In total around 580 animals were used, 186 were euthanized, no found dead. Cause of death was always consequences of sepsis.

On d5 the surviving mice were randomly allocated to receive IL-7 or no further treatment. Recombinant human IL-7 (R&D Systems), which is known to bind and signal via the mouse IL-7 receptor [31], was subcutaneously injected (2.5 µg/mouse/day) from d5 post sepsis induction for the following 6 days. In order to stabilize the cytokine, IL-7 was precipitated with a ten-fold higher concentration of an anti-human IL-7 antibody (clone M25; BioXCell) [32].

### Immunization with *Aspergillus* antigen

The *Aspergillus* antigen gliotoxin sulfhydryl oxidase (GliT) was produced as described [33] and kindly provided by D.H. Scharf and O. Kniemeyer (Hans Knöll Institute, Jena). GliT is an enzyme involved in the biosynthesis of the mycotoxin gliotoxin by the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. The protein was dissolved in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) / 50% glycerol. Mice were immunized subcutaneously with GliT in complete Freund's adjuvant (CFA SIGMA) at d30 after sepsis induction. One week later the mice were sacrificed, the spleens were harvested and the antigen-specific T cells analyzed.

### Cell culture and flow cytometry

Spleens were isolated and single cell suspensions were obtained by passing through strainers (BD Falcon). Erythrocytes were lysed using ammonium chloride solution. Cells were counted in a Neubauer chamber. Absolute numbers of cell populations were calculated by multiplying the total spleen cell count with the frequency of the respective population as determined by flow cytometry.

For flow-cytometric analyses, cells were stained with live/dead fixable aqua dead cell stain kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cells were incubated with anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2, in house production) and fluorophore-conjugated antibodies directed against surface antigens, CD3 (clone 145-2C11, in house production), CD4 (clone GK1.5; eBioscience); CD8 (clone YTS169.4, in house production); CD62L (clone MEL14, in house production); CD154 (clone MR, Miltenyi Biotec) CD44 (clone IM7, BioLegend).

GliT-specific T cells were analyzed following stimulation of  $1 \times 10^7$  / mL lymph node or spleen cells with 3 µg/ml anti-mouse CD28 (clone 37.51) and 200 µg/ml aspergillus antigen

GLiT for 6 hours in a humidified incubator at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>. After 2 hours of incubation 1μl Brefeldin A (5μg/ml AppliChem A2138.0025) was added to each sample for the final 4 hours. GLiT-specific T cells were fixed in buffer containing 2% paraformaldehyde, permeabilized with buffer containing 0.5% saponin and stained with fluorophore-conjugated monoclonal antibody against tumor necrosis factor (TNF)-α (MP6-XT22l; eBioscience), IL-17 (TC11-18H10.1; BioLegend), IFNγ (clone XMG1.2, Bio X Cell), IL-10 (clone JES5-16E3, BioLegend) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (MP1-22E9, eBioscience).

Data from the samples were collected with a LSR II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). Cytokine-expressing cells were identified by hierarchical gating for living, living CD4<sup>+</sup>, and living CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> cells. Cytokine patterns among cells were analyzed by boolean gating on either TNFα<sup>+</sup> cells or NOT-TNFα<sup>+</sup> cells and subsequent analysis of quadrant gating on IFNγ<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup>, IFNγ<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, IFNγ<sup>-</sup>IL-17<sup>+</sup>, or IFNγ<sup>-</sup>IL-17<sup>-</sup> cells.

### T-cell receptor (TCR) diversity analysis

Mice were sacrificed and spleens were harvested. Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Ambiom) from 10<sup>7</sup> unsorted spleen cells of every septic and sham mouse. mRNA was purified with Direct-zol RNA MiniPrep (ZymoResearch). Complementary (c)DNA synthesis was performed with M-MLV reverse Transcriptase (Affymetrix), RNasin Plus (Promega) and reverse transcriptase Primer (C1 segment of β-chain, Biotex) according to the manufacturers' recommendations. To generate templates for the High-throughput (HT) sequencing, the cDNA was amplified with primers spanning the whole complementarity-determining region (CDR)3 starting from 5' Vβ 1,2,3,5,9,12–2,13–1,13–2,13–3,14,16,17,19,20,26 and from 3' with the C1 segment of the β-chain (all primers were purchased from Biotex). Multiplex PCR was performed using a Multiplex PCR Kit (Qiagen) and finally purified with agarose gel electrophoresis and a Gel DNA-Recovery Kit (Zymoresearch). Subsequently, the Nextera XT library preparation kit (Illumina) was used to generate a sequence ready library according to the manufacturer's protocol. The library was run on a MiSeq Sequencer (Illumina) with a 300 cycle MiSeq reagent kit v2 (Illumina). Obtained sequences were annotated by IMMUNOGENETICS (IMGT). All downstream data analysis was done using in-house bash and R scripts (version 3.2.2), which are available upon request. First, only productive amino acid sequences were taken for further analysis. Clones were identified based on identical CDR3 sequences. In addition, all results were represented as percentages of productive reads to normalize between samples. For further calculations, samples were normalized to 50000 reads and analyzed using the library vegan (cran.r-project). Trimmed fastq-data and the products of R-script were uploaded to ArrayExpress (E-MTAB-7483).

### Statistic evaluation and graphs

All data were statistically evaluated using SPSS. Comparisons involving multiple groups were analyzed in a two-stage procedure by one-way ANOVA. If the ANOVA indicated a significant difference between the groups ( $P < 0.05$ ), all groups were further compared pairwise by Tukey's multiple comparison test. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Data are expressed as mean ± SEM as indicated in the figure legends. All graphs were created by using SigmaPlot.

## Results

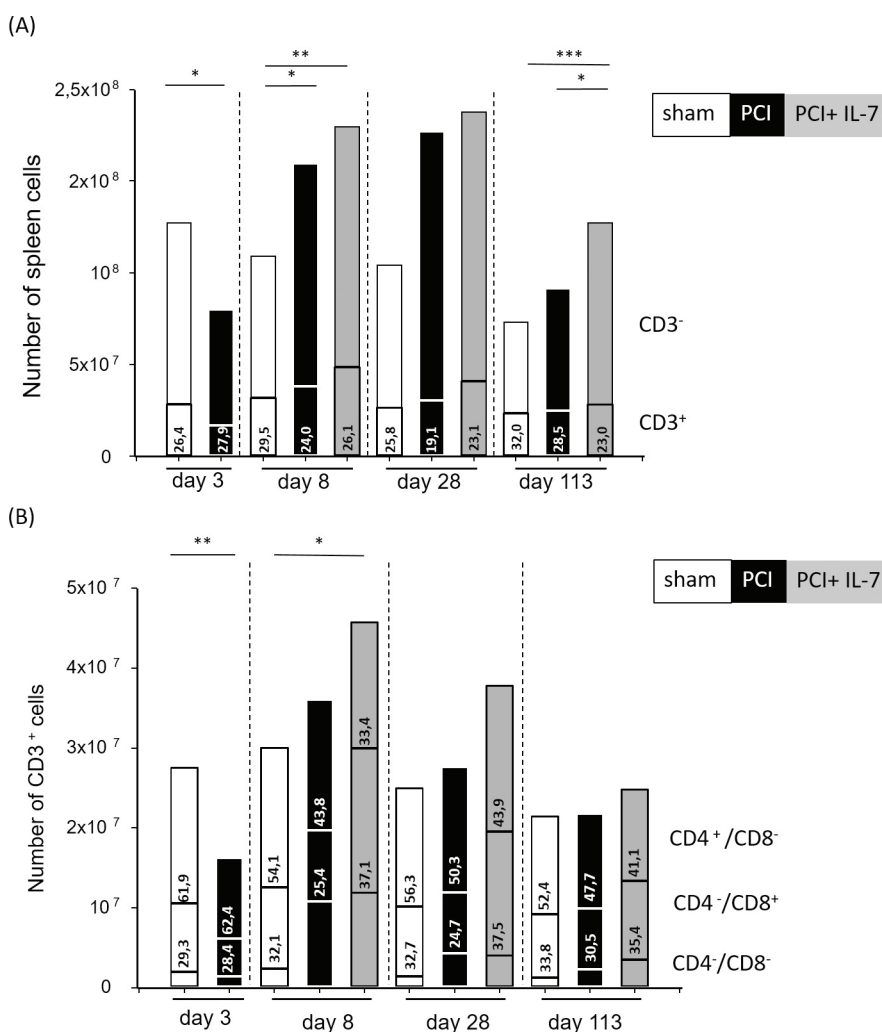
### Lymphopenia and recovery of T-lymphocyte numbers after sepsis

T lymphocytes undergo apoptosis in both septic animals [13] or patients [11,34,35]. To determine the quality and kinetics of T-lymphocyte recovery after experimental sepsis we examined

T lymphocytes in the secondary lymphatic organs of mice for 3.5 months after sepsis induction in the PCI model. In addition, mice were randomly allocated to the IL-7 treatment group, which was treated subcutaneously with 2.5 µg recombinant human IL-7 daily from d5–9 post sepsis induction, or the control group, which received no further treatment.

As described earlier [16], the mortality within the first five days after sepsis induction was >40%. Thereafter mortality was approximately 10% within the following 30 days and similar in IL-7 treated or non-treated mice throughout observation period of 3.5 months.

In sham-treated mice the total number of cells in the spleen did not change during the first four weeks of observation. At d113 the number of cells was significantly lower ( $p < 0.005$ ), compatible with the known effects of aging in mice [36–38] (Fig 1A). In septic mice there was a dramatic decrease of spleen cells at day d3 after sepsis induction. Thereafter, cell numbers quickly recovered and were even significantly higher than in sham mice at d8 after sepsis induction. IL-7 treatment from d5–9 resulted in significantly higher spleen cell numbers as



**Fig 1. The loss of T lymphocytes in acute sepsis is followed by a rapid and sustained increase in T-lymphocyte numbers.** Mice were injected with PBS i.p. (sham) or subjected to sepsis induction (PCI) or sepsis-induction plus IL-7 treatment (PCI + IL-7). At the indicated time points between d3 and d113 after PCI at least 6 mice per group were sacrificed and splenic cell numbers determined. (A) absolute cell numbers and frequencies of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in the spleen; (B) numbers and frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in the spleen.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716.g001>

compared with non-treated septic mice only at the very late time point (d113) after sepsis induction (Fig 1A).

The frequency (Fig 1A) and number (Fig 1B) of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in the spleen was nearly constant in the sham mice during the observation period. In septic mice, a reduction of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes occurred at d3 after sepsis induction as expected [13]. Numbers and frequencies of T lymphocytes quickly recovered thereafter and were similar to those in sham-treated mice from d8 through d113 (Fig 1B). In contrast, the initial loss of lymphocytes was more than compensated in IL-7 treated septic mice, which harboured significantly more CD3<sup>+</sup> cells in their spleen compared with sham mice d8 after sepsis induction (Fig 1B). This increase was still detectable, however no longer significant, at d28 and at d113, when the numbers and frequencies of T lymphocytes were similar in all three groups (Fig 1B). The percentage and number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was strongly increased in sepsis-surviving mice at day 8 after PCI with or without IL-7 treatment (see also [16]). Moreover, there was a massive increase in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells after sepsis in the IL-7 treated mice (Fig 1B). The numbers and frequencies of CD4<sup>+</sup> T cells largely reflected the number and frequencies of all T lymphocytes: a massive drop at d3 after sepsis induction was followed by a rapid reconstitution while no significant difference in CD4<sup>+</sup> T cell numbers between the three groups of mice was recognised.

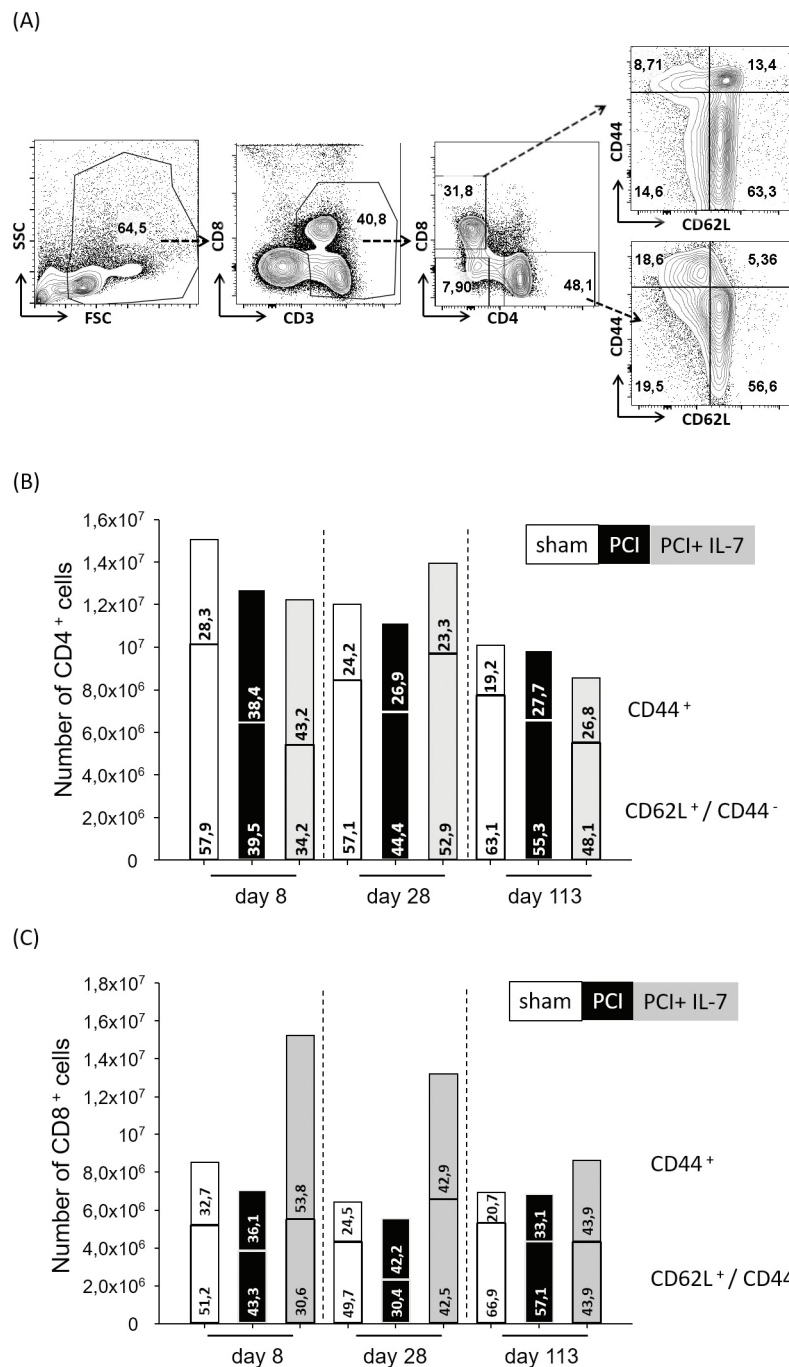
### Recovery of naive and effector T cells after sepsis

The survival and homeostasis of naive and effector T cells are controlled by different mechanisms [39,40]. We examined the long-term consequences of sepsis on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> naive (CD62L<sup>hi</sup> CD44<sup>+</sup>) and effector/memory (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> or <sup>+</sup>) T lymphocytes (Fig 2A). At d8, both the number and the percentage of naive CD4<sup>+</sup> T cells were significantly lower in septic mice than in sham-mice, regardless of whether the septic mice were IL-7 treated or not (Fig 2B). In septic mice, numbers and frequencies of naive CD4<sup>+</sup> T cells quickly recovered thereafter and were not significantly different from those in control mice. In IL-7-treated septic mice the recovery of naive CD4<sup>+</sup> T cells occurred faster than in the septic mice that had not received IL-7. 113 days after sepsis induction the numbers and frequency of naive CD4<sup>+</sup> T cells were similar in all three groups of mice. Immediately after sepsis, at day 8 after PCI, the number of CD8<sup>+</sup> T cells was significantly higher in the IL-7 treated septic mice than in the two other groups (Fig 2C). This was almost exclusively due to a significantly higher number and frequency of CD8<sup>+</sup> effector memory cells in the IL-7 treated mice. At d28 after PCI the number of CD8<sup>+</sup> T cells was still significantly higher in the IL-7 treated group of septic mice, again mostly due to an increase in effector/memory cells. At d113 post PCI the frequency and numbers of CD8<sup>+</sup> effector/memory cells were significantly higher in the IL-7 treated group compared with the sham-treated mice. Taken together, the numbers and frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> naive and effector/memory cells quickly recovered and there were no significant differences among the three groups of mice except for a higher number and frequency of CD8<sup>+</sup> effector/memory cells in IL-7 treated septic mice.

### Sepsis causes a transient reduction in thymic output

Our data thus far have shown that the overall number of T lymphocytes as well as the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations including the naive T cells have largely returned to normal values 3.5 months after sepsis. The recovery of T cell populations could be due to increased thymic output after sepsis or to homeostatic proliferation of those T cell clones which survived during sepsis. We used RAG2p-GFP transgenic mice [30] to examine thymic output after sepsis (Fig 3A). In these mice the RAG2 promoter drives green fluorescent protein (GFP) expression and the GFP signal remains detectable for some time even after the RAG gene is no longer

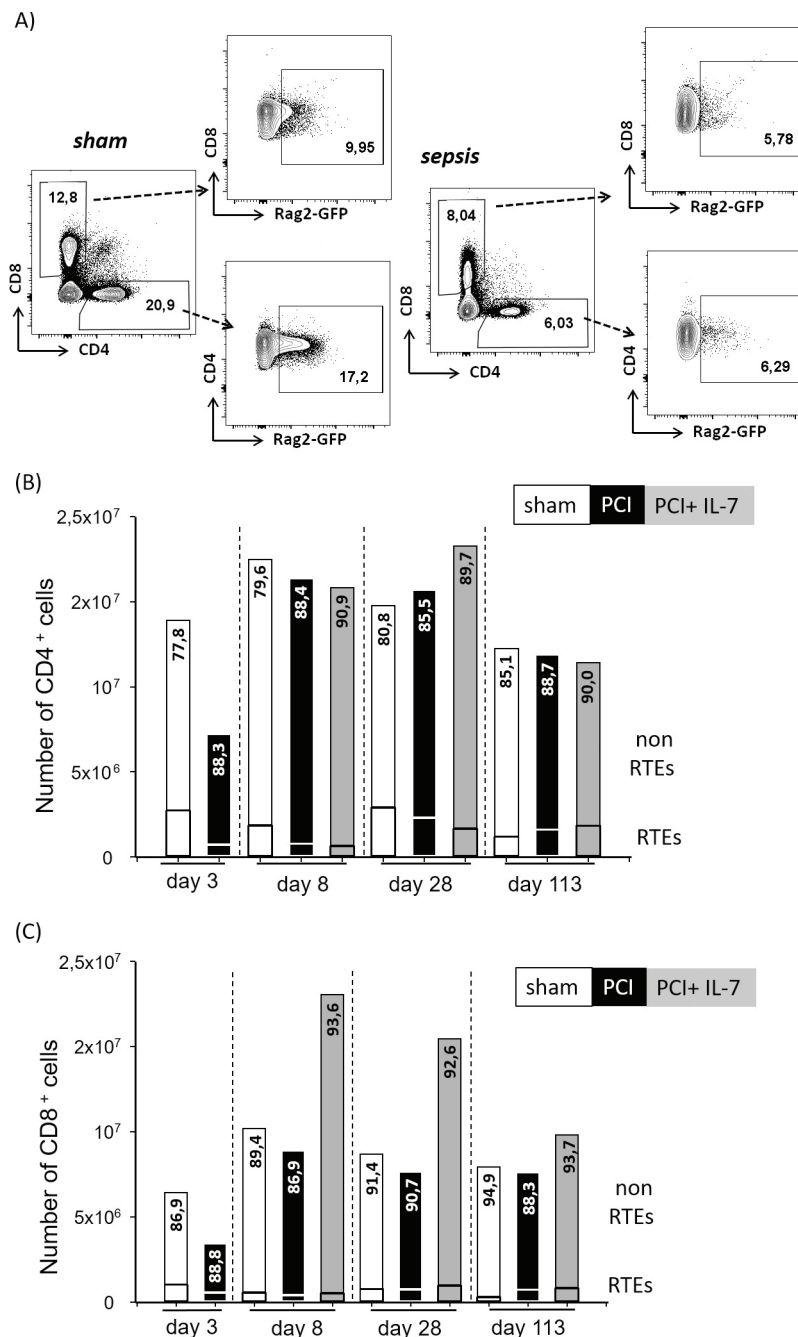




**Fig 2. Recovery of naive and effector/memory T lymphocytes after sepsis.** Mice were injected with PBS i.p. (Sham) or subjected to sepsis induction (PCI) or sepsis-induction plus IL-7 treatment (PCI + IL-7). At the indicated time points between d8 and d113 after PCI at least 6 mice per group were sacrificed and spleen cells analyzed by flow cytometry. (A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed for their expression of CD62L and CD44 and categorized as naive cells (CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>-</sup>) or effector/memory cells (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> or CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>). (B-C) Longitudinal analysis of numbers and frequencies of (B) naive and effector/memory CD4<sup>+</sup> T cells or (C) naive and effector/memory CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716.g002>

expressed [41]. In accordance with the literature [42] approximately 20% of the CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen of sham mice were recent thymic emigrants (RTEs); at d113 this frequency was



**Fig 3. Repopulation of the peripheral T cell pool by recent thymic emigrants (RTEs) after sepsis.** B6.Rag2-GFP mice were injected with PBS i.p. (sham) or subjected to sepsis induction (PCI) or sepsis induction plus IL-7 treatment (PCI + IL-7). At the indicated time points between d3 and d113 after PCI, at least 6 mice per group were sacrificed and spleen cells analyzed by flow cytometry. (A) RTEs within the CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> lymphocyte population were identified by their expression of green fluorescent protein. (B, C) Longitudinal analysis of numbers and frequencies of RTEs among (B) T cells or RTEs among (C) cytotoxic T cells.

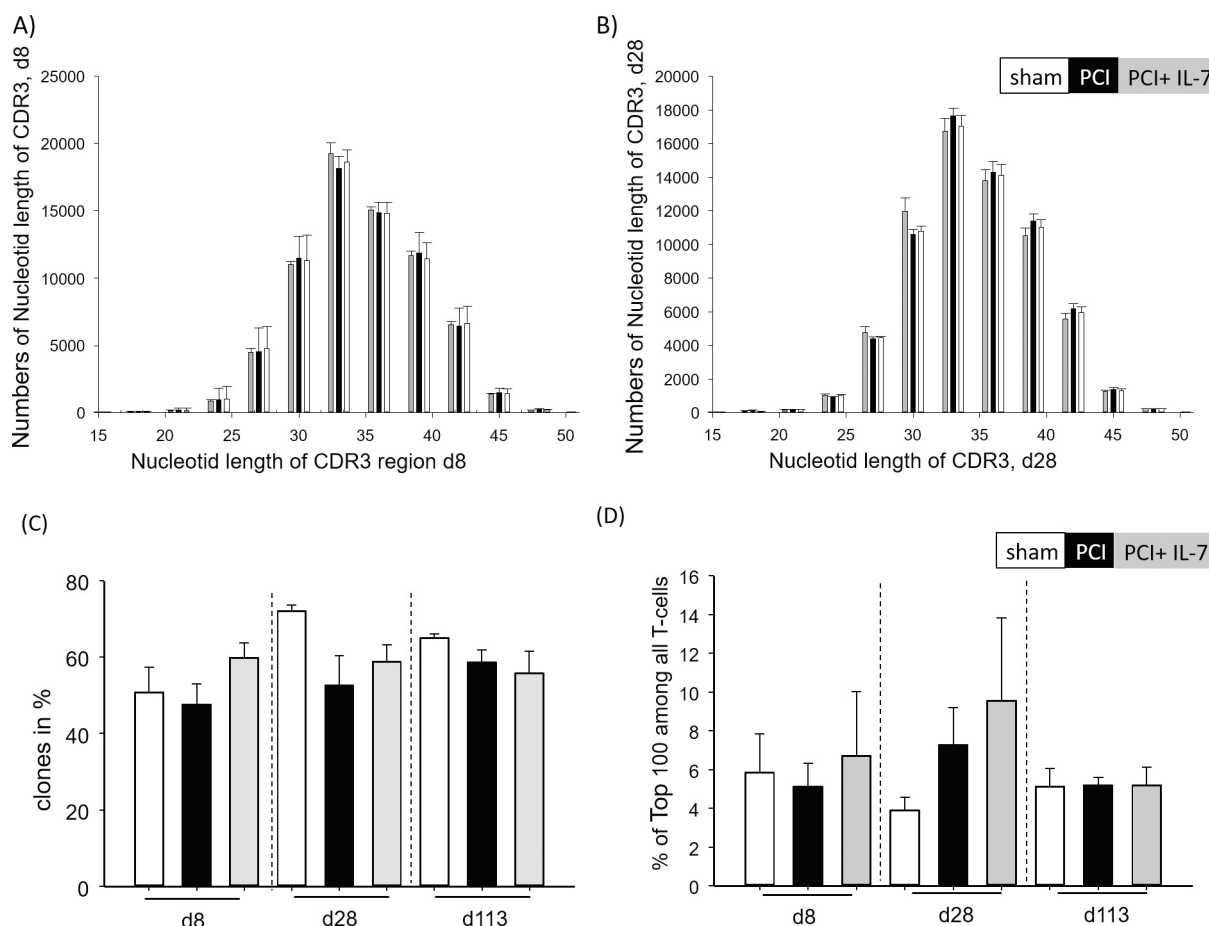
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716.g003>

slightly lower at 15% (Fig 3B). The percentage of CD4<sup>+</sup> RTEs was reduced to approximately 11% in septic mice at d3 and d8 after PCI. Given that cell numbers were similar in septic and sham mice at d8, the reduced percentage of RTEs indicates homeostatic proliferation of

surviving clones. The number of RTEs slowly increased thereafter and the difference between sham mice and septic mice was no longer significant at d28 and d113 after PCI. The treatment of septic mice with IL-7 did not have a significant impact on the number of CD4<sup>+</sup> RTEs (Fig 3B). Regarding the frequency of CD8<sup>+</sup> RTEs there was no significant difference between septic mice and controls at any time point (Fig 3C). IL-7 treatment did not influence the number of CD8<sup>+</sup> RTEs (Fig 3C).

### Next generation sequencing (NGS) reveals no global decrease in T-cell receptor (TCR)-repertoire diversity in post-septic mice

We next asked whether the transient reduction in thymic output resulted in a less diverse TCR repertoire in mice that had survived sepsis. To obtain a more detailed picture of TCR diversity we used next generation sequencing for high-throughput analyses of the TCR-repertoires. First, we examined the clonal composition of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes by determining the distribution of CDR3 lengths (spectratyping). Gaussian distributions of CDR3 lengths were observed d8 (Fig 4A) and d28 (Fig 4B) after PCI. To assess T-cell receptor diversity we chose the percentage of unique clonotypes in 50,000 cDNAs generated from individual mice, which



**Fig 4. Analyses of TCR diversity after sepsis.** Mice were injected with PBS i.p. (sham) or subjected to sepsis induction (PCI) or sepsis-induction plus IL-7 treatment (PCI + IL-7). At the indicated time points between d8 and d113 after PCI at least 4 mice per group were sacrificed, the spleens were harvested and TCRs were sequenced and analyzed as described in *Materials and Methods*. (A) CDR3 length (nucleotides) of T cells at day 8 after PCI. (B) CDR3 length (amino acids) of T cells at day 28 after PCI. (C) percentage of unique clones among all TCR transcripts analyzed. (D) Percentage of the 100 most frequently occurring clonotypes among all TCR transcripts analyzed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716.g004>



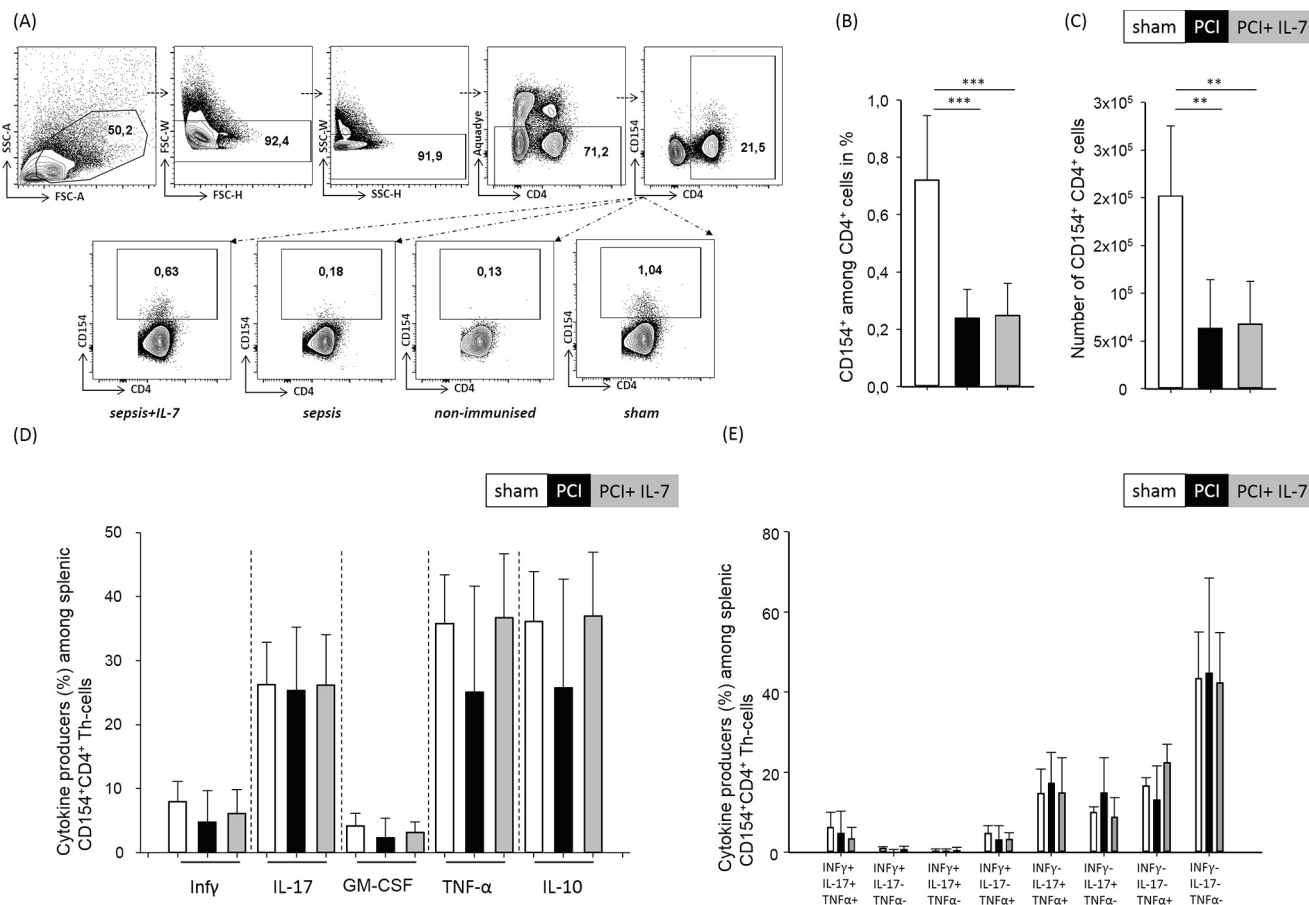
has been demonstrated to correlate strongly with other widely used approaches e.g. the Shannon-Wiener index or the Chao1 index [43]. At all analyzed time points the percentage of individual clonotypes in unsorted T cells varied between 50 and 70% and there was no significant difference between the three groups of mice (Fig 4C). To examine further if there was preferential clonal outgrowth after sepsis we analyzed the portion of the repertoire occupied by the 100 most frequently occurring TCR sequences at d8, d28 and d113 after PCI. Similar to earlier findings [43], the share of the 100 top-frequency clonotypes was 4–10% with no significant differences between the three groups or time-points (Fig 4D). Taken together, global analyses of TCR transcript diversity did not reveal significant differences between control mice and septic mice that had either received IL-7 treatment or not.

### Blunted T-cell responses against fungal antigen in mice that had survived sepsis

Secondary infections, including fungal infections, contribute significantly to sepsis mortality. Efficient T-cell responses against pathogens do not only rely on a broad TCR repertoire but also on the swift induction of the appropriate effector functions. We, therefore, analyzed the T cell response against the *Aspergillus* antigen gliotoxin sulphydryl oxidase (GLiT) [33]. Thirty days after sepsis induction mice were immunized with GLiT in CFA s.c.. Seven days later, the mice were sacrificed and the T cell response to GLiT was assayed by determination of CD154 expression after a brief (6 hr) period of in vitro restimulation with GLiT (Fig 5A). Compared with sham mice the percentage and numbers of CD154<sup>+</sup> GLiT-specific CD4<sup>+</sup> T helper cells was significantly reduced in the spleen of septic mice regardless of whether they had received IL-7 treatment or not (Fig 5B and 5C). Thus, the number of GLiT-specific Th cells was significantly blunted in mice that had survived sepsis despite the fact that these mice had no obvious reduction in TCR-repertoire diversity (Fig 4). We next examined the cytokine production of GLiT-specific Th cells. The frequencies of IFN- $\gamma$ -, IL-17-, GM-CSF-, TNF- $\alpha$ , or IL-10-producing cells among the CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Th cells was similar in all three groups of mice (Fig 5C). Moreover, the frequencies of CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> GLiT-specific Th cells that produced more than one cytokine in response to GLiT was similar in all three groups of mice (Fig 5D). Therefore, whereas the number of GLiT-specific Th cells was significantly reduced in mice that had survived sepsis, the cytokine-producing capacity within this diminished pool of cells remained intact.

### Discussion

Massive apoptosis of lymphocytes is a hallmark of sepsis. We performed a long-term examination of the quantitative and qualitative T-lymphocyte recovery after sepsis. In accordance with earlier studies [4,9,10] we found rapid, complete and stable recovery of T cell numbers after sepsis. Similar to what has been observed in recent clinical trials [28] administration of recombinant human IL-7 accelerated and enhanced the recovery of T lymphocytes. Although CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells express the IL-7R at similar levels [24], we found that the beneficial effect of IL-7 treatment on T cell recovery was more pronounced for CD8<sup>+</sup> T cells than for CD4<sup>+</sup> T cells, which confirms and extends earlier reports on other sepsis models [25,26,44]. Recovery of T cell numbers could occur via two different, not mutually exclusive, mechanisms. The apoptotic loss of lymphocytes could be overcome by homeostatic proliferation of the surviving clones, which depends largely on IL-7 and IL-15 together with low-affinity interactions of the TCR with p/MHC complexes [39,45]. Homeostatic proliferation is thought to be the main mechanism for T cell replenishment in adult humans [39,40]. Homeostatic proliferation of surviving clones would fail to generate new TCR specificities and result in a narrowed TCR



**Fig 5. Impaired Th-cell response to fungal antigen after sepsis.** Mice were injected with PBS i.p. (sham) or subjected to sepsis induction (PCI) or sepsis-induction plus IL-7 treatment (PCI + IL-7). 30 days after sepsis induction at least 5 mice from each group were immunized subcutaneously with the *Aspergillus* protein antigen GliT in complete Freund's adjuvant. Seven days later the mice were sacrificed and the spleens were harvested. (A) Upon brief ex vivo culture with the antigen, GliT-specific Th cells were identified by flow cytometry using T cell-characteristic FSC/SSC criteria, doublet exclusion, exclusion of dead cells via fixable dead cell dye, and by simultaneous expression of CD4 and CD154. (B) Percentages of CD154<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> cells and (C) total number of CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. (D) Frequencies of cytokine-producing GliT-specific Th cells among CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. (E) Frequencies of polyfunctional GliT-specific Th cells were analyzed by boolean gating on TNF-, IFN $\gamma$  - and IL-17-producing cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211716.g005>

repertoire [39,45]. Moreover, data from mouse models suggest that homeostatic proliferation favours T cells with TCRs displaying higher affinity for self-peptide/MHC complexes [46]. Therefore, over the course of many years, homeostatic proliferation could result in an increased risk for autoimmune responses. Alternatively, thymic output could be increased to replenish the peripheral T cell pool with newly generated naive T cells. To date, very little is known about the relative contributions of homeostatic proliferation and increased thymic output to T cell recovery after sepsis. To estimate thymic output after sepsis we used RAG2p-GFP transgenic mice [30] in which the RAG2 promoter drives GFP expression and the GFP signal remains detectable in recent thymic emigrants for approximately three weeks after the RAG gene is no longer expressed [41]. Compatible with earlier reports on sepsis-induced thymic atrophy [47,48] we found a decreased number of GFP<sup>+</sup> recent thymic emigrants (RTEs) up to 8 days after sepsis. Thereafter, the frequency of RTEs was similar in control mice, septic mice and septic mice treated with IL-7, compatible with earlier reports that had indicated that thymic output is not influenced by the number of T cells in the periphery [41]. When comparing thymectomized and euthymic mice in the CLP model, Cabrera-Perez et al. also found no

influence of the thymus on quantitative T-cell recovery after sepsis [49]. IL-7 treatment did not influence the frequency of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> of GFP<sup>+</sup> RTEs, which is consistent with earlier reports on altered IL-7 signaling and responsiveness in RTEs as compared with naive T cells undergoing homeostatic proliferation [24,41,50]. In the absence of increased thymic output the recovery of T cells after sepsis-induced lymphopenia seems to occur largely via homeostatic proliferation, which might result in a diminished diversity of the TCR repertoire [39,45]. Indeed, a decreased TCR repertoire diversity was reported in sepsis patients [51]. We used next generation sequencing to determine TCR diversity in post-septic mice. Despite the fact that there was no increased thymic output these analyses did not reveal a narrowed TCR repertoire. Sepsis-survivors are burdened with an increased risk of secondary infections [4,9,10,17–19]. Similarly, post-septic mice are more susceptible to secondary infections [26,44,49,52–57]. This could be explained by the loss of particular T-cell clones after sepsis, which might be undetectable even by the analysis of large numbers of TCR sequences [49]. Alternatively, sepsis could result in functional T-cell defects [58] [12] [56]. Thirdly the sepsis-induced expansion of immunosuppressive cell populations such as regulatory T cells, IL-10 producing B-cells and myeloid derived suppressor cells (MDSC) [16] could inhibit T cell effector functions. Finally, severe infections can result in a loss or functional impairment of antigen-presenting cells, resulting in altered T-cell activation and consequently an increased susceptibility to secondary infections [59] [60] [61] [58] [62]. Which (combination) of these mechanisms is relevant for post-septic immunosuppression is currently unknown. We asked whether sepsis-induced immunosuppression was long-lasting and aimed at determining the underlying mechanisms. Immunization of mice with the fungal antigen GliT 30 days after sepsis induction revealed a strongly reduced number of GliT-specific Th-cells in post-septic mice, regardless of whether they had been treated with IL-7 or not. Importantly, on a per-cell basis the effector functions were not different between septic mice and control mice. The GliT specific Th cells from all three groups of mice were similarly capable of producing TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, GM-CSF or IL-10. Moreover, within the GliT-specific Th cell population, the frequency of cells that were capable of producing two or three cytokines simultaneously was similar in all three groups of mice. These findings support an earlier report by Markwart et al. [63], who assayed the intrinsic functions of TCR-transgenic T cells in septic mice. Our data are in contrast to earlier reports on sepsis-induced T-cell intrinsic functional impairments [58] [12] [56]. This difference may be explained by the fact that we analyzed Th cell responses 30 days after sepsis rather than during the acute sepsis episode. Our data are best compatible with a loss of GliT-specific T cell clones, which was undetectable by NGS analyses of the TCR repertoire. It is currently thought that in a naive repertoire, each individual T cell clone occurs in about 10<sup>2</sup> copies. Our data are compatible with a loss of approximately 50% of the GliT-specific Th cells after sepsis. Such a loss would not be detectable with bulk methods, including NGS. Our data would also be compatible with immune suppression by IL-10 producing B cells and MDSC which are still increased in numbers 30 days after sepsis [16].

Taken together, our studies revealed a prompt reconstitution of T-lymphocyte numbers after sepsis. Whereas sensitive global analyses using NGS did not detect holes in the post-septic T-cell repertoire, our functional analyses 30 days after sepsis revealed an impaired T-cell response against a fungal antigen.

## Conclusion

Our study demonstrates long-lasting impairments in CD4<sup>+</sup> T-cell responses despite rapid recovery of T-lymphocyte populations after sepsis. Whereas numerical recovery of T lymphocytes occurred quickly after sepsis and was accelerated by IL-7 treatment, the Th cell response

against a fungal antigen was impaired 1 month after sepsis, regardless of IL-7 treatment. The impaired response was due to a reduced number of antigen-specific Th cells, the remaining clones were functionally intact. Our findings show that functionally relevant losses of T cell clones may go unnoticed even by sensitive global assays such as next generation sequencing of T cell receptors. Moreover, our data indicate decreased T cell responses as long-term sequelae of sepsis and suggest that this lasting immunodeficiency contributes to the increased morbidity and mortality observed in sepsis survivors.

## Acknowledgments

The authors wish to thank D. Himsel, A. Krause, F. Rost and B. Schikowski for expert technical assistance and D.H. Scharf and O. Kniemeyer (Hans Knöll Institute, Jena) for providing the fungal antigen GliT.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Thomas Kamradt.

**Data curation:** Nico Andreas, Martin Ungelenk, Sarina Ravens, Christian Hübner, Angela Kather, Ingo Kurth, Michael Bauer.

**Funding acquisition:** Michael Bauer, Thomas Kamradt.

**Investigation:** Christoph Ammer-Herrmenau, Upasana Kulkarni, Martin Ungelenk, Ingo Kurth.

**Project administration:** Thomas Kamradt.

**Software:** Sarina Ravens.

**Supervision:** Thomas Kamradt.

**Writing – original draft:** Christoph Ammer-Herrmenau, Thomas Kamradt.

**Writing – review & editing:** Christoph Ammer-Herrmenau, Nico Andreas, Thomas Kamradt.

## References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903338
2. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. (2016) Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193: 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
3. Torio C, Andrews R (2013) National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. HCUP Statistical Brief #160. August 2013.: Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD; <http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb160.pdf>. Accessed February 17, 2018.
4. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. (2016) Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45> PMID: 28117397
5. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 43: 304–377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6> PMID: 28101605
6. Bauer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kortgen A, Moller E, Felsmann K, Cavaillon JM, et al. (2016) A Transcriptomic Biomarker to Quantify Systemic Inflammation in Sepsis—A Prospective Multicenter Phase II Diagnostic Study. *EBioMedicine* 6: 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.006> PMID: 27211554

7. Scicluna BP, van Vught LA, Zwinderman AH, Wiewel MA, Davenport EE, Burnham KL, et al. (2017) Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 5: 816–826. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30294-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30294-1) PMID: [28864056](#)
8. Deutschman CS, Tracey KJ (2014) Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* 40: 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001> PMID: [24745331](#)
9. Delano MJ, Ward PA (2016) The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274: 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499> PMID: [27782333](#)
10. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG (2017) The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 17: 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.36> PMID: [28436424](#)
11. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27: 1230–1251. PMID: [10446814](#)
12. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. (2011) Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306: 2594–2605. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1829> PMID: [22187279](#)
13. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY (1994) Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 152: 5014–5021. PMID: [8176219](#)
14. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. (2002) Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18: 487–494. PMID: [12462554](#)
15. Adrie C, Lugosi M, Sonnevile R, Souweine B, Ruckly S, Cartier JC, et al. (2017) Persistent lymphopenia is a risk factor for ICU-acquired infections and for death in ICU patients with sustained hypotension at admission. *Ann Intensive Care* 7: 30. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0242-0> PMID: [28303547](#)
16. Kulkarni U, Herrmenau C, Win SJ, Bauer M, Kamradt T (2018) IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. *PLOS ONE* 13: e0192304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192304> PMID: [29466409](#)
17. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, et al. (2011) The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 15: R183. <https://doi.org/10.1186/cc10332> PMID: [21798063](#)
18. van Vught LA, Wiewel MA, Hoogendijk AJ, Frencken JF, Scicluna BP, Klein Klouwenberg PM, et al. (2017) The Host Response in Sepsis Patients Developing Intensive Care Unit-acquired Secondary Infections. *Am J Respir Crit Care Med* 196: 458–470. <https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1225OC> PMID: [28107024](#)
19. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. (2014) Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One* 9: e98819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098819> PMID: [24919177](#)
20. van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J et al. (2016) Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 315: 1469–1479. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.2691> PMID: [26975785](#)
21. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. (2010) Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med* 38: 1276–1283. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d> PMID: [20308885](#)
22. Donnelly JP, Hohmann SF, Wang HE (2015) Unplanned Readmissions After Hospitalization for Severe Sepsis at Academic Medical Center-Affiliated Hospitals. *Crit Care Med* 43: 1916–1927. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001147> PMID: [26082977](#)
23. Yende S, Austin S, Rhodes A, Finfer S, Opal S, Thompson T, et al. (2016) Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis: Analyses of Two International Trials. *Crit Care Med* 44: 1461–1467. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001658> PMID: [26992066](#)
24. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11: 330–342. <https://doi.org/10.1038/nri2970> PMID: [21508983](#)
25. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, et al. (2010) IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* 184: 3768–3779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903151> PMID: [20200277](#)
26. Shindo J, Fuchs AG, Davis CG, Eitas T, Unsinger J, Burnham C-AD, et al. (2017) Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Leukoc Biol* 101: 543–554. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A1215-581R> PMID: [27630218](#)
27. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, et al. (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* 189: 5073–5081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202062> PMID: [23053510](#)



28. Francois B, Jeannet R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, et al. (2018) Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3.
29. Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, et al. (2011) Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res* 170: e123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.019> PMID: 21737102
30. Yu W, Nagaoka H, Jankovic M, Misulovin Z, Suh H, Rolink A, et al. (1999) Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* 400: 682–687. <https://doi.org/10.1038/23287> PMID: 10458165
31. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. (1989) Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 302–306. PMID: 2643102
32. Martin CE, van Leeuwen EM, Im SJ, Roopenian DC, Sung YC, Surh CD (2013) IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood* 121: 4484–4492. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449215> PMID: 23610371
33. Scharf DH, Remme N, Heinekamp T, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C (2010) Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc* 132: 10136–10141. <https://doi.org/10.1021/ja103262m> PMID: 20593880
34. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, DeMaso CM, Ayala CA, Chaudry IH (1995) The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock* 3: 259–267. PMID: 7600193
35. Toti P, De Felice C, Occhini R, Schuerfeld K, Stumpo M, Epistolato MC, et al. (2004) Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am J Clin Pathol* 122: 765–771. <https://doi.org/10.1309/RV6E-9BMC-9954-A2WU> PMID: 15491973
36. Linton PJ, Dorshkind K (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5: 133–139. <https://doi.org/10.1038/ni1033> PMID: 14749784
37. Wang J, Geiger H, Rudolph KL (2011) Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol* 23: 532–536. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.05.004> PMID: 21872769
38. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K (2013) Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest* 123: 958–965. <https://doi.org/10.1172/JCI64096> PMID: 23454758
39. Boyman O, Letourneau S, Krieg C, Sprent J (2009) Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol* 39: 2088–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.200939444> PMID: 19637200
40. den Braber I, Mugwagwa T, Vriskoop N, Westera L, Mogling R, de Boer AB, et al. (2012) Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity* 36: 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.006> PMID: 22365666
41. Fink PJ (2013) The biology of recent thymic emigrants. *Annu Rev Immunol* 31: 31–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100010> PMID: 23121398
42. Boursalian TE, Golob J, Soper DM, Cooper CJ, Fink PJ (2004) Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* 5: 418–425. <https://doi.org/10.1038/ni1049> PMID: 14991052
43. Izraelson M, Nakonechnaya TO, Moltedo B, Egorov ES, Kasatskaya SA, Putintseva EV, et al. (2017) Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires. *Immunology*.
44. Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, et al. (2012) Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis* 206: 606–616. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis383> PMID: 22693226
45. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE (1996) Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 156: 4609–4616. PMID: 8648103
46. Kassiotis G, Zamoyska R, Stockinger B (2003) Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J Exp Med* 197: 1007–1016. <https://doi.org/10.1084/jem.20021812> PMID: 12707300
47. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG (1997) Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 7: 247–253. PMID: 9110409
48. Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Hotchkiss RS, Ferguson TA (2009) Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *J Leukoc Biol* 85: 382–390. <https://doi.org/10.1189/jlb.0808491> PMID: 19088177
49. Cabrera-Perez J, Condotta SA, James BR, Kashem SW, Brincks EL, Rai D, et al. (2015) Alterations in antigen-specific naive CD4 T cell precursors after sepsis impairs their responsiveness to pathogen challenge. *J Immunol* 194: 1609–1620. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401711> PMID: 25595784

50. Kim HK, Waickman AT, Castro E, Flomerfelt FA, Hawk NV, Kapoor V, et al. (2016) Distinct IL-7 signaling in recent thymic emigrants versus mature naive T cells controls T-cell homeostasis. *Eur J Immunol* 46: 1669–1680. <https://doi.org/10.1002/eji.201546214> PMID: [27129922](#)
51. Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, et al. (2013) Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med* 41: 111–119. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182657948> PMID: [23222261](#)
52. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL (2003) Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 163: 2605–2617. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63615-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63615-2) PMID: [14633632](#)
53. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, Unsinger J, Dunne WM, Hotchkiss RS (2006) Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock* 26: 565–570. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000235130.82363.ed> PMID: [17117130](#)
54. Davis CG, Chang K, Osborne D, Walton AH, Dunne WM, Muenzer JT (2011) Increased susceptibility to *Candida* infection following cecal ligation and puncture. *Biochem Biophys Res Commun* 414: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.017> PMID: [21939638](#)
55. Gurung P, Rai D, Condotta SA, Babcock JC, Badovinac VP, Griffith TS (2011) Immune unresponsiveness to secondary heterologous bacterial infection after sepsis induction is TRAIL dependent. *J Immunol* 187: 2148–2154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101180> PMID: [21788440](#)
56. Duong S, Condotta SA, Rai D, Martin MD, Griffith TS, Badovinac VP (2014) Polymicrobial sepsis alters antigen-dependent and -independent memory CD8 T cell functions. *J Immunol* 192: 3618–3625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303460> PMID: [24646738](#)
57. Condotta SA, Khan SH, Rai D, Griffith TS, Badovinac VP (2015) Polymicrobial Sepsis Increases Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8+ T Cell Exhaustion. *J Immunol* 195: 116–125. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402473> PMID: [25980007](#)
58. Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, et al. (2011) Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 15: R70. <https://doi.org/10.1186/cc10059> PMID: [21349174](#)
59. Lyn-Kew K, Rich E, Zeng X, Wen H, Kunkel SL, Newstead MW, et al. (2010) IRAK-M regulates chromatin remodeling in lung macrophages during experimental sepsis. *PLoS One* 5: e11145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011145> PMID: [20585389](#)
60. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168: 2493–2500. PMID: [11859143](#)
61. Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, Rani M, Agrawal H, Schade FU, et al. (2011) Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 186: 977–986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001147> PMID: [21160046](#)
62. Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, Tian Z, Cinotti R, Rimbart M, et al. (2017) Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* 47: 135–147 e135. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.021> PMID: [28723546](#)
63. Markwart R, Condotta SA, Requardt RP, Borken F, Schubert K, Weigel C, et al. (2014) Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PLoS One* 9: e115094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115094> PMID: [25541945](#)

## 5 Diskussion

Im Rahmen der Promotion wurden zwei Publikationen veröffentlicht. Beide behandelten das Thema der T-Zell-Rekonstitution im Rahmen einer Sepsis aus verschiedenen Blickwinkeln. Ausgangspunkt aller Experimente war die noch nicht geklärte Ursache für die Langzeitmortalität nach Sepsis, die in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde. Eine plausible Erklärung scheint hierfür eine langanhaltende Immunsuppression im Allgemeinen und einen Defekt im T-Zell-Kompartiment im Speziellen zu sein.

In dem wissenschaftlichen Artikel „Sepsis induces long-lasting impairments in T helper cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations“ konnte gezeigt werden, dass sich die T-Zell-Zahl am 8. Tag nach Sepsis-Induktion normalisierte und im Verlauf keine eingeschränkte T-Zell-Rezeptor („TZR“) Diversität nachgewiesen werden konnte. Jedoch fiel in einem Immunisierungsexperiment auf, dass die T-Zellen von septischen Tieren keine adäquate Immunantwort auf ein Pilz-Antigen bilden konnten. Und dies zu einem Zeitpunkt, als T-Zell-Zahl und Diversität bereits wiederhergestellt waren (Ammer-Herrmenau et al. 2019).

Mögliche Ursachen für diese T-Zell-Dysfunktion wurden in der Publikation „IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells“ beschrieben (Kulkarni et al. 2018). Dort wurde das antiinflammatorische Setting beleuchtet, dem die T-Zellen im Zuge einer Sepsis ausgesetzt sind. Suppressiv Immunzellen, wie B-regulatorische Zellen (Bregs) und Myeloid suppressor Zellen (MDSCs), sind langfristig in ihrer Zahl erhöht und in der Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen aktiv.

In beiden Artikeln wurden auch die möglichen Auswirkungen einer IL-7-Therapie und deren Einfluss auf den Sepsis-Verlauf erörtert.

### 5.1 Sepsis bei Mäusen und Übertragbarkeit auf den Menschen

Eine 2013 publizierte Korrelationsstudie stellte die These auf, dass das Maus-Modell nur sehr bedingt auf den Menschen übertragbar sei. Die Genexpression bei Inflammation, Trauma oder Verbrennung wäre, dieser Publikation zu Folge, zwischen den Spezies zu unterschiedlich (Seok et al. 2013). 2015 wiederum erschien im gleichen Journal eine Publikation, die die Ergebnisse mit konventionellerer Statistik reevaluierte und zu einem gänzlich gegensätzlichen Ergebnis kam (Takao und



Miyakawa 2015). Die Autoren hoben hervor, dass sich Mensch und Maus in ihrer Immunantwort sehr ähneln, v.a. in Hinsicht auf ihre Genexpression.

Eine weitere Studie aus Jena, welche die Genexpression septischer Mäuse mit Daten von PatientInnen verglich, zeigte eine hohe Korrelation (Lambeck et al. 2012). Das in diesem Experiment angewandte „Peritoneal Contamination and Infection“ (PCI)-Modell wurde auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit als Methode der Sepsis-Induktion gewählt.

Jedoch muss betont werden, dass das Tiermodell bei all seinen Ähnlichkeiten mit den menschlichen Abläufen in einigen Punkten idealisiert ist. Die Wahrscheinlichkeit eines Menschen an einer Sepsis zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter und mit der Anzahl und Ausprägung von Ko-Morbiditäten. Des Weiteren unterscheidet sich die Sepsis Inzidenz zwischen den Geschlechtern und der ethnischen Herkunft (Esper et al. 2006). Die Mäuse waren jedoch gleichen Geschlechts, Alters und genetischer Abstammung.

Mit Hilfe des PCI-Modelles wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eine Mortalität von 40% in den ersten 3 Tagen erreicht. Diese ist vergleichbar mit der Sterblichkeitsrate beim Menschen (Engel et al. 2007). Weiterhin zeigten die publizierten Analysen am dritten Tag nach der Sepsis-Induktion eine Reduktion aller Lymphozyten-Populationen von 50%. Dies entspricht ebenfalls dem Ausmaß einer menschlichen Lymphopenie im Rahmen einer Sepsis (Hotchkiss et al. 1999, Felmet et al. 2005). Auch das charakteristische Multiorganversagen zeigte bei den PCI Mäusen Ähnlichkeiten zu Verläufen septischer PatientInnen. Unter anderem wurden mikrovaskuläre Leberschäden, respiratorische Insuffizienzen und Thrombozytopathien vergleichbar mit humanen Befunden beobachtet (Gonnert et al. 2011).

In Zusammenschau dieser Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie der Sepsis bestehen letztlich viele Gemeinsamkeiten zwischen murinen und humanen Abläufen. Aus diesem Grund erscheinen Rückschlüsse von Daten, die im Mausmodell generiert wurden, auf den Menschen nicht nur möglich, sondern auch sinnvoll.

## 5.2 Dauer und Ausprägung der Lymphopenie, Einfluss von IL-7 und Vergleich der PCI- und CLP-Modelle

Am dritten Tag nach Sepsis-Induktion wurde eine starke Lymphopenie beobachtet. Die B-, T- und NK-Zellen waren bis zu 50% reduziert. Dies deckt sich mit verschiedenen murinen und humanen Sepsis-Publikationen (Hotchkiss et al. 2001,

Unsinger et al. 2009, Hotchkiss et al. 1999). Am 8. Tag nach PCI jedoch normalisierten sich die absoluten Anzahlen der T-Zellen wieder. Prozentual auf alle Zellpopulationen der Milz war allerdings noch eine signifikante Reduktion zu verzeichnen. Dies resultierte vor allem aus der massiven Proliferation myeloider Immunzellen. Abweichend zu den vorliegenden Ergebnissen berichteten Unsinger et al. von einer kompletten Erholung von der Lymphopenie erst an Tag 21 nach Sepsis-Beginn (Unsinger et al. 2009). Eine Erklärung hierfür sind möglicherweise unterschiedliche Sepsis-Modelle. Unsinger et al. induzierten eine Peritonitis mittels des *Cecal ligation and puncture*-(CLP)-Modell. Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Bauchfellentzündung ausgelöst, jedoch mit dem *Peritoneal Contamination and Infection* (PCI)-Modell.

Ein 2017 von Seemann et al. publizierter Vergleich der Sepsis-Modelle zeigte viele Gemeinsamkeiten zwischen dem PCI- und CLP-Modell. So waren die Ausmaße der Zytokinproduktion in der akuten Phase, die initialen Hypothermie, die Gewichtsabnahme, der oxidative Stress der Organe und das klinische Erscheinungsbild vergleichbar. Jedoch betonten die Autoren auch, dass es Unterschiede im Hinblick auf die Dynamik der Sepsis gibt (Seemann et al. 2017). Viele biologische und immunologische Parameter und deren Modifikationen wurden später, dafür langfristiger, in den CLP- Mäusen nachgewiesen. Die Autoren folgerten deshalb, dass das CLP-Modell geeigneter für längerfristig ausgelegte Experimente sei. Da die Versuche der vorliegenden Arbeiten im Zeitraum von 2013-2016 durchgeführt wurden, lagen sie vor der Veröffentlichung der oben zitierten vergleichenden Studie. Vor diesem Hintergrund ist die Überprüfung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des CLP-Modells von wissenschaftlichem Interesse. Da das PCI-Modell am Universitätsklinikum Jena am besten etabliert war, fiel die Entscheidung zum Beginn der Experimente für diese Art der Sepsis-Induktion. Die je nach Sepsis-Modell variable Dynamik könnte somit Ursache für die unterschiedlichen Zeitpunkte der T-Zell-Zahl Rekonstitution sein.

Ein hervorzuhebendes Ergebnis, das sich unabhängig vom gewählten Sepsis-Modell, sowohl in den Experimenten der vorliegenden Arbeit, wie auch in den von Unsinger et al. publizierten Versuchen bestätigte, ist der alternierende Effekt von IL-7 auf die T-Zellen im Rahmen einer Sepsis.

Interessanterweise beeinflusste die IL-7 Therapie verstärkt die CD8<sup>+</sup>-Zell Rekonstitution. Die zytotoxischen T-Zellen proliferierten über das Niveau der

Kontrolltiere hinaus und exprimierten vermehrt Gedächtniszellmarker. Anders als von Lundstrom et al. in ihrem Review herausgearbeitet, konnte nur ein geringer Effekt des IL-7 auf CD4<sup>+</sup>- Zellen nachgewiesen werden (Lundstrom et al. 2012). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Unsinger et al. (Unsinger et al. 2010, Unsinger et al. 2012). Im septischen Setting scheinen zytotoxische T-Zellen gegenüber IL-7 empfindlicher als T-Helferzellen zu sein.

### 5.3 Eingeschränkte T-Zellantwort trotz wiederhergestellter T-Zell-Zahl

Wie bereits beschrieben normalisierte sich die T-Zell-Zahl nach 8 Tagen wieder. Die T-Zellen wurden im Folgenden weiter hinsichtlich ihrer Immunantwort untersucht. Dafür wurden die Tiere mit einem Aspergillus-Antigen, gliotoxin sulfhydryl oxidase (GliT), immunisiert (Scharf et al. 2010). Gegen dieses Antigen bauen viele Menschen eine spezifische T-Zell Antwort auf (Bacher et al. 2014). Aspergillus fumigatus ist ein Schimmelpilz, der vor allem Immunsupprimierte infiziert und mit einer hohen Letalität im Zuge einer invasiven Infektion vergesellschaftet ist (Segal 2009).

Interessanterweise konnten die septischen Mäuse, unabhängig davon, ob diese eine IL-7 Therapie erhielten oder unbehandelt blieben, kaum GliT spezifische T-Zellen bilden. Dieses Experiment wurde einen Monat nach PCI durchgeführt und zeigte, dass das T-Zell- Kompartiment trotz erholter T-Zell- Zahl noch dysfunktional war.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung andere Antigene für die Immunisierung veröffentlicht (Cabrera-Perez et al. 2015, Condotta et al. 2015). Als Ursachen für die T-Zell-Dysfunktion kommen verschiedene Hypothesen in Betracht. Ursächlich könnte eine T-Zell- Exhaustion sein. Hiergegen spricht, dass die wenigen T-Zellen, die auf das Antigen reagierten, das gleiche Ausmaß an Zytokinen wie die Kontrolle produzierten. Die These der T-Zell Paralyse wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen falsifiziert. Borken et al. konnten, aufbauend auf früheren Mausexperimenten, im Blut septischer Patienten zeigen, dass die Aktivierung des TZR, die Hochregulierung von Aktivierungsmarkern, die IL-2 Produktion und die klonale Expansion im Vergleich zu gesunden Probanden nicht eingeschränkt sind (Borken et al. 2017, Markwart et al. 2014). Als weitere mögliche Erklärung für die mangelnde T-Zell-Antwort nennen einige AutorInnen eine APC-Dysfunktion (Guisset et al. 2007, Faivre et al. 2012). Auch eine eingeschränkte TZR-Diversität oder der hemmende Effekt regulatorischer Zellen könnten Erklärungsansätze für dieses Phänomen darstellen. Diese beiden Thesen werden im Folgenden näher beleuchtet.

#### 5.4 Rekonstitution von T-Zellen: Homöostatische Proliferation (HP) und Integration von recent thymic emigrants (RTEs)

Ein eingeschränktes TZR Repertoire könnte aus einer unzureichenden T-Zell-Rekonstitution nach Lymphopenie resultieren. Die Erholung der T-Zell-Zahl kann auf verschiedener Art und Weise erfolgen. Der Körper ist dabei immer bestrebt eine bestimmte T-Zell-Zahl aufrecht zu erhalten. Dieses Phänomen wird T-Zell Homöostase genannt. In der bereits erwähnten Arbeit, die von Unsinger et al. veröffentlicht wurde, stellten sich die AutorInnen die Frage nach dem Mechanismus der T-Zell Rekonstitution im Rahmen einer Sepsis (Unsinger et al. 2009). Dabei konnten sie mit eleganten Transfer-Experimenten zeigen, dass sich die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Zellen unterschiedlicher Mechanismen bedienen. Diesen Ergebnissen nach teilen sich zytotoxische T-Zellen wahrscheinlich Antigen-unabhängig. Dies wird von den AutorInnen als homöostatische Proliferation (HP) bezeichnet. Die T-Helfer Zellen dagegen waren abhängig von einem kognaten Antigen und IL-7.

Konträr zu Unsingers Auslegung einer homöostatischen Proliferation (Zellteilung unabhängig von einem Antigen), steht die allgemein akzeptierte Definition einer HP, die unter anderem von Goldrath und Bevan sowie Ernst et al. postuliert wird. Demzufolge benötigen proliferierenden T-Zellen nach einer Lymphopenie ein schwach affines Antigen und IL-7 (Goldrath und Bevan 1999, Ernst et al. 1999). Dieses schwach affine Antigen kann ein körpereigenes oder ein Antigen aus der Umwelt sein. Reaktion auf Ersteres birgt jedoch die Gefahr einer oligoklonalen Expansion autoreaktiver T-Zellen (Baccala und Theofilopoulos 2005).

Ein weiterer Nachteil dieses Reparaturvorganges nach Lymphopenie ist die eingeschränkte T-Zell-Rezeptor Diversität, wie Mackall et al. an Knochenmark transplantierten Mäusen erforschten (Mackall et al. 1996). Wenn ein geschrumpfter T-Zell-Pool sich nur durch Teilung quantitativ normalisiert, ist die TZR-Diversität gleich der des lymphopenischen Ausgangszustandes. Wenn, wie in den hier diskutierten Tag 3 Experimenten beobachtet, eine T-Zell Reduktion von 50% bestand, könnte eine HP zu einer langwährenden Lücke in der TZR-Diversität führen. Um einen Hinweis auf eine stattgehabte HP zu erhalten, wurden zunächst die Gedächtnis/ Effektor-Marker an den unterschiedlichen T-Zellpopulationen analysiert. Gemäß den bereits oben erwähnten Publikationen ändern sich bei der HP die Zelloberflächenproteine der sich teilenden T-Zellen. Die naiven Zellen exprimieren nach diversen Zellteilungen Proteine, die typisch für Gedächtnis-/Effektor-Zellen sind

(Goldrath et al. 2000). Entsprechend unserer Vermutung konnten wir mittels fluorescence-activated cell sorting- (FACS-) Analysen absolut und prozentual vermehrt sogenannte Gedächtnis-/Effektor-Marker am 8. Tag nach PCI detektieren. Der vermehrte Nachweis von CD44<sup>+</sup> ließ Rückschlüsse auf abgelaufene Zellteilung und damit auf eine stattgefundene HP im CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Kompartiment zu. Dies kann ein Hinweis auf eine eingeschränkte Diversität sein. Dieser Effekt konnte in beiden septischen Gruppen (mit IL-7 behandelt oder unbehandelt) beobachtet werden. Eine weitere Ursache für die vermehrte Expression von CD44<sup>+</sup> könnte der Kontakt der übrig gebliebenen T-Zellen mit TZR-spezifischen Antigenen sein. Im Zuge einer polymikrobiellen Sepsis ist davon auszugehen, dass eine Vielfalt von Antigenen T-Zellen von APZ-Zellen präsentiert werden. An dieser Stelle ist zu betonen, dass es nicht die Absicht der vorliegenden Arbeit war, die HP im Rahmen einer Sepsis nachzuweisen. Die generierten Daten geben lediglich Hinweise auf eine abgelaufene HP im CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Kompartiment.

Alternativ zur HP können sich T-Zellen, die frisch aus dem Thymus emigrierten, in den peripheren T-Zell- Pool integrieren und mit ihren frisch generierten TZR die Diversität erhöhen. Bekannt ist, dass der Thymus eine drastische Involution im Zuge einer Sepsis erfährt (Hiramatsu et al. 1997). Dies konnte auch makroskopisch am Tag 8 an den PCI-Mäusen bestätigt werden. Erst einen Monat nach Sepsis wurde bei der Präparation der meisten Tiere ein Thymus von normaler Größe beobachtet (nicht publizierte Daten). Um die T-Zell Produktion des Thymus weiter zu analysieren wurde Sepsis in Rag2-GFP B6 Mäusen induziert. Diese Methode ist derzeit der Goldstandard für die Detektion von Recent thymic emigrants (RTEs) (Fink 2013). Hierbei wurde ein Unterschied zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>- Zellen evident. Trotz des geschrumpften Thymus konnte kein quantitatives Defizit der CD8<sup>+</sup>-RTEs nachgewiesen werden. Das CD8<sup>+</sup>-Kompartiment scheint seine Diversitätslücken mit RTEs füllen zu können, sodass sich keine TZR Repertoire Einschränkungen ergeben müssten. Unter der Berücksichtigung der vermehrt exprimierten Gedächtniszell-Markern, die für eine HP sprechen, kann eine Rekonstitution des CD8<sup>+</sup>-Kompartiments durch beide Mechanismen vermutet werden.

Im Gegensatz dazu waren CD4<sup>+</sup>-RTEs eine Woche nach Sepsis vermindert -bei normaler CD4<sup>+</sup>-Zell-Zahl am Tag 8- und erholten sich erst nach einem Monat.

Dies kann zunächst dahingehend interpretiert werden, dass der Thymus zur Rekonstitution der T-Helferzellen eine untergeordnete Rolle spielt. Vor diesem

Hintergrund scheint die HP für die Normalisierung des CD4<sup>+</sup>-Kompartiments einen größeren Beitrag zu leisten. Nun hat jedoch das RTE-Detektionsmodell mittels Rag2-GFP B6 Mäuse eine inhärente Schwäche, da RTEs nach wiederholter Zellteilung in der Peripherie nicht mehr nachgewiesen werden können. Das Rag2-Gen wird nur bei der Rekombination des TZR im Thymus transkribiert. Bei diesem Vorgang wird auch das eingebaute Green fluorescent protein (GFP) abgeschrieben und exprimiert. Wenn die T-Zelle nun einen TZR aufweist und in die Peripherie entlassen wird, wird das Rag2-Gen nicht weiter transkribiert. Demzufolge entsteht auch kein neues GFP, über das die RTEs detektiert werden können. Teilt sich nun die Zelle, verdünnt sich der GFP-Gehalt der Zelle bis zu einem Grad, an dem es nicht mehr nachgewiesen werden kann (Kim et al. 2016). Das heißt, die CD4<sup>+</sup>-RTEs könnten schlicht aufgrund der hohen Zellteilungsrate in der Peripherie weniger nachweisbar sein. Dies ließe jedoch nicht auf eine verminderte RTE-Produktion schließen. Gleiches könnte auch auf die CD8<sup>+</sup>-Zellen zutreffen. Somit wäre die Beteiligung des Thymus an der Rekonstitution der CD8<sup>+</sup>-Zell-Zahl sogar unterschätzt. Beide Mechanismen –die HP und die Integration der RTEs in den peripheren T-Zellpool– scheinen zur Erholung der T-Zell-Zahl beizutragen. Eine endgültige Aussage, wie sich dies auf die TZR-Diversität auswirkt, lässt sich anhand dieser Daten zunächst nicht treffen, weshalb diese im Weiteren genauer analysiert wurde.

### 5.5 TZR-Diversitätsanalyse und der Effekt von IL-7 auf das TZR Repertoire

Es wurde schon in einigen Arbeiten postuliert, dass das TZR-Repertoire bei Sepsis kurzzeitig eingeschränkt ist. Unter anderem untersuchten Venet et al. mittels Multi-N-Plex polymerase chain reaction (PCR) das Blut septischer PatientInnen. Dabei beobachteten sie eine Normalisierung der Diversität am 7. Tag nach Sepsisbeginn (Venet et al. 2013). Limitierend bei dieser Methodik war, dass nur nach dem Vorhandensein einzelner V-β Familien gefahndet wurde. Eine detailliertere Analyse auf Nukleotid-Basis wurde bis zur Veröffentlichung des hier diskutierten Artikels noch nicht angestrengt. Das next generation sequencing (NGS) schlüsselt die einzelnen Basenkombinationen der CDR3 Regionen auf. Mit dieser Technologie kann demzufolge eine profundere Analyse der TZR-Diversität gewährleistet werden (Izraelson et al. 2018).

Es wurden 50.000 Sequenzen (d.h. verschiedene TZR) pro Maus und Zeitpunkt analysiert. In der vorausgegangenen Multiplex PCR amplifizierten wir die TZR cDNA

von 15 verschiedenen V $\beta$ -Familien. Insgesamt besitzen jedoch C57/Bl6 Mäuse 35 verschiedene V $\beta$ -Segmente. Dies hat zur Folge, dass unter Auslassung 20 weiterer V $\beta$ -Segmente und der gesamten  $\alpha$ -Ketten nicht die absolute TZR Diversität bestimmt werden konnte, sondern nur ein repräsentativer Ausschnitt genauer erforscht wurde. Trotz dieser Einschränkung ermöglichte die NGS eine viel profundere Analyse des TZR-Repertoires, als z.B. die von Venet et al. verwendete Methodik. Die absolute TZR-Diversität kann auch mit NGS lediglich abgeschätzt werden. Andere Arbeitsgruppen, die die TZR-Diversität verglichen, bedienten sich ähnlicher Sequenzanzahlen, wie in der hier vorliegenden Publikation (Laydon et al. 2015).

Wir arbeiteten vor allem den Anteil der einzigartigen Klone an der Gesamtzahl heraus und verglichen die Häufigkeiten der Top 100-Klone zwischen den Gruppen. Diese beiden Parameter flossen schließlich in die Publikation ein. Um Anschluss an die Arbeit von Venet et al. zu finden, wurde weiterhin das sogenannte *spectratyping* der CDR3-Länge veröffentlicht. Diese schon lange etablierte Methode ist vergleichbar mit der Methode, die bei Venet et al. zur Anwendung kam und stellt die Nukleotid-Länge der einzelnen CDR3-Regionen gegenüber. Aus Gründen der Redundanz verzichteten wir auf die Präsentation des Shannon-Indexes, der weiterhin ein Maß für die Unterschiedlichkeit mehrerer TZR Repertoires darstellt (Izraelson et al. 2018).

Als ein Hauptergebnis ist hervorzuheben, dass ab dem 8. postseptischen Tag kein Unterschied bezüglich der CDR3-Längen, Anteile der einzigartigen Klone und der Top 100-Klone zwischen der PCI-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren bestand. Damit konnte die Hypothese von Venet et al. mit der profunden Methode des NGS verifiziert werden, dass die TZR Diversität an Tag 8 nach Sepsis-Induktion nicht länger eingeschränkt ist. Der periphere T-Zell-Pool scheint sich also zumindest teilweise mittels frisch aus dem Thymus emigrierter T-Zellen rekonstituiert zu haben. Bei der Betrachtung des normalen Prozentsatzes von circa 60% einzigartiger Klone bietet sich ein weiterer Erklärungsansatz: Bei der initialen Apoptose, von der 50% der T-Zellen betroffen waren, könnten vor allem Kopien bestimmter Klone zugrunde gehen. Das legt die Vermutung nahe, dass es initial nicht zu einer allzu starken Divpenie kommt, die sich bis zum 8. Tag wieder erholt. In einer weiterführenden Arbeit wäre deshalb interessant die Diversität am 3. postseptischen Tag zu bestimmen.

Da Mäuse ihre T-Zell-Homöostase anders als der Mensch regulieren, sind die gewonnenen Ergebnisse nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Während der Thymus bei der Maus eine ausgeprägte Rolle bis ins höhere Alter spielt, ist dieser beim Menschen seit der Adoleszenz involuiert. Beim Menschen ist die Proliferation von naiven T-Zellen die treibende Kraft, um die T-Zell-Zahl aufrecht zu erhalten (den Braber et al. 2012).

Um diesen Unterschied zwischen Mensch und Maus genauer herauszuarbeiten, müssten NGS-Analysen mit T-Zellen septischer PatientInnen durchgeführt werden. Wenn der Thymus kaum zur Rekonstitution beitragen kann, könnte die durch Apoptose verursachte Divpenie ein langfristig eingeschränktes T-Zell-Kompartiment zur Folge haben.

Die IL-7 Therapie stellte keinen herausragenden Nutzen bezüglich der TZR Diversität dar. Am ersten Analysetag (Tag 8 nach PCI), nach dreimaliger Gabe des Medikamentes, konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dies steht im Kontrast zur Arbeit von Sportés et al. Diese Arbeitsgruppe konnte an gesunden Probanden zeigen, dass nach IL-7 Gabe sowohl die CD8<sup>+</sup>- als auch die CD4<sup>+</sup>-Zellen eine erhöhte Diversität aufwiesen (Sportes et al. 2008). Dies scheint im septischen Setting für Mäuse nicht zu gelten.

### 5.6 Suppression der T-Zellen durch regulatorische Zellen

In Zusammenschau aller diskutierten Ergebnisse kann der Schluss gezogen werden, dass das T-Zell Kompartiment sich schnell erholt und eine normale T-Zell-Zahl, normale TZR-Diversität und eine vermutlich normale T-Zell Emigration aus dem Thymus aufweist. Außerdem scheint, wie oben diskutiert, keine T-Zell-Exhaustion vorzuliegen. Diese Betrachtungen stehen nun im Gegensatz zum signifikant schlechteren Ansprechen der T-Zellen auf das Aspergillus Antigen einen Monat nach PCI. Wenn auch die Signalkaskade der T-Zellen intakt ist, erscheint es plausibel, dass sich die T-Zellen in einem antiinflammatorischen Milieu bewegen, das eine adäquate Antwort auf ein Umwelt-Antigen supprimiert. Um diese Überlegung zu verifizieren, wurden eine Reihe bekannter immunsupprimierender Zellen in den PCI Mäusen untersucht. Mit dieser Thematik beschäftigt sich vor allem der Artikel „IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells“. Hier wurde die Expansion von IL-10 produzierenden B-Zellen, auch B-regulatorische Zellen (Bregs) genannt, sowie der Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) dargelegt. Weiterhin wurden die



doppelt negativen T-Zellen (DN-T-Zellen: weder CD8 noch CD4 positiv) und Tregs und deren Dynamiken nach Sepsis betrachtet.

Die Rolle der Tregs im Rahmen einer Sepsis wird kontrovers diskutiert. So zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass Tregs eine Sepsis positiv, negativ oder kaum beeinflussen (Bermejo-Martin et al. 2016, Kuhlhorn et al. 2013, Tatura et al. 2015). Die hier publizierten Experimente konnten keinen Unterschied zwischen septischen Mäusen und den Kontrollmäusen nachweisen und lediglich einen transienten Anstieg in der IL-7 behandelten Gruppe verdeutlichen. Dies könnte ein Hinweis auf eine antiinflammatorische Komponente von IL-7 sein.

Die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN-)T-Zellen waren vor allem am 8. Tag nach PCI in beiden septischen Gruppen stark erhöht. Es konnte jedoch anhand der Zytokine keine eindeutige immunsupprimierende Wirkung dieser Zellpopulation nachgewiesen werden.

Bedeutungsvoller sind die Bregs und MDSCs betreffenden Ergebnisse. Diese immunsupprimierenden Zellen waren bis Tag 113 signifikant erhöht. Für die MDSCs konnte auch gezeigt werden, dass diese stark Proliferation-hemmende Wirkung auf T-Zellen besitzen. Dabei war es nicht relevant, ob MDSCs oder T-Zellen von IL-7 behandelten Mäusen stammten oder von Unbehandelten.

Hieraus kann geschlossen werden, dass der immunsupprimierende Effekt von außen auf T-Zellen deren Dysfunktion stärker erklärt als ein inhärenter Schaden des T-Zell-Kompartiments. Auch diese Beobachtung gilt es in zukünftigen Experimenten am Menschen zu verifizieren.

Zusammenfassend wäre es lohnenswert eine NGS Analyse der TZR Diversität und weiterführende MDSC-Untersuchungen mit Proben septischer PatientInnen anzustrengen. Wie bereits oben beschrieben, erschien 2017 die erste Studie über MDSCs im Blut septischer PatientInnen. Diese analysierte die ProbandInnen jedoch nur in einem 28 Tage-Zeitraum (Mathias et al. 2017). Lohnend wäre eine Untersuchung von MDSCs von Sepsisüberlebenden über einen längeren Zeitraum und ob die Anzahl dieser Zellpopulation mit der Langzeitsterblichkeit korreliert.

### 5.7 IL-7-Therapie und ihre Auswirkung auf die Sepsismortalität

Eine Sepsis spezifische Therapie zu implementieren ist Gegenstand großer Forschungsanstrengung in den letzten Jahren gewesen. Da Sepsis eine weitreichende immunologische Störung darstellt, wurden schon früh immunmodulierende Substanzen erprobt. Am erfolgversprechendsten scheinen

derzeit eine rekombinanten humanen IL-7 (rhIL-7)- und eine Anti-programmed cell death factor-1 (PD-1)-Therapie zu sein (Hotchkiss et al. 2013). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden ein Teil der septischen Mäuse mit IL-7 behandelt. Dieses wurde bereits nebenwirkungsarm und effektiv als Therapeutikum anderer Krankheiten wie z.B. HIV eingesetzt (Levy et al. 2009, Lundstrom et al. 2012). Weiterhin kam IL-7 in Sepsis-Experimenten bei Mäusen mehrfach zum Einsatz (Unsinger et al. 2010, Unsinger et al. 2012, Shindo et al. 2017). Die erste Studie an septischen Patienten wurde im Frühjahr 2018 publiziert und zeigte eine sehr gute Verträglichkeit und eine signifikante Steigerung der Lymphozytenzahlen. Aussagen über Mortalitätsreduktion konnten in dieser kleinen Studie nicht getroffen werden (Francois et al. 2018).

Unsinger et al. führten bereits umfangreiche Versuche mit IL-7 durch, sodass sie für die hier publizierten Versuche hinsichtlich Dosis, Anzahl der behandelten Tage und Stabilisierung des Zytokins mit einem Antikörper (M25) als Orientierung dienten. Die Ergebnisse der AutorInnen beeindruckten mit einem deutlichen Überlebensvorteil der IL-7 therapierten septischen Mäuse. Die T-Zellen der behandelten Gruppe waren in der absoluten Anzahl, der Zytokin-Ausschüttung und Funktionalität denen der septischen unbehandelten Mäuse signifikant überlegen (Unsinger et al. 2012, Unsinger et al. 2010, Shindo et al. 2017).

Trotz des ähnlichen Experimentaufbaues konnten wir keinen Überlebensvorteil in der IL-7 therapierten septischen Maus-Gruppe beobachten. Der Unterschied lässt sich durch die divergierenden Zeitpunkte des Therapiebeginnes erklären. Bei Unsinger et al. wurde IL-7 90 Minuten nach Sepsis-Induktion verabreicht. Ein Haupteffekt des IL-7 war dabei das Verhindern der massiven Apoptose von T-Zellen. Der Überlebensvorteil der septischen Mäuse bei Unsinger et al. könnte demzufolge daraus resultieren, dass die Tiere keine ernsthafte Lymphopenie durchlebten.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die rhIL-7-Therapie bewusst am 5. Tag nach PCI begonnen. Damit war garantiert, dass sich jede Maus in der T-Zell-Rekonstitution nach Lymphopenie befand, die bereits am Tag 3 beobachtet wurde.

Dieser Ansatz scheint der klinischen Praxis näher zu kommen, in der ein rapider Beginn der Apoptose beschrieben wird. Auch wurde bei vielen PatientInnen bei Diagnosestellung einer Sepsis eine ausgeprägte Lymphopenie nachgewiesen, deren Ausmaß mit der Letalität korrelierte (Drewry et al. 2014). Deshalb ist anzunehmen, dass eine potenzielle IL-7-Therapie in der Praxis zumeist im lymphopenischen

Stadium erfolgen wird. Dies wiederum hätte, den Daten der vorliegenden Publikationen zufolge, keinen Effekt. Zusätzlich konnte im Zuge einer IL-7 Therapie, wie oben bereits diskutiert, keine Diversitätssteigerung, keine stärkere T-Zell-Antwort und keine erhöhte Resistenz gegenüber dem hemmenden Effekt von regulatorischen Zellen wie MDSCs beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sind bedeutend, da bereits andere Zytokin-modifizierende Therapien in klinischen Studien keine oder gegensätzliche Effekte erbrachten, IL-7 aber in einer bereits erwähnten Verträglichkeitsstudie an septischen Patienten getestet wurde (Reinhart und Karzai 2001, Francois et al. 2018).

## 6 Schlussfolgerungen

Sepsis ist mit einer hohen Mortalität assoziiert und hat enorme längerfristig währende Auswirkungen auf viele Zellpopulationen des Immunsystems. Die durchschnittliche Mortalitätsrate in den durchgeführten Experimenten lag bei 40%. Dies entspricht den Ergebnissen von Publikationen anderer Arbeitsgruppen und ist vergleichbar mit der Mortalität beim Menschen.

Die Zahl der T-Zellen erreicht 3 Tage nach Sepsisbeginn einen Tiefpunkt. Dabei gehen 50% der T-Zellen in den programmierten Zelltod. Nach 8 Tagen hat sich die Zell-Zahl jedoch wieder normalisiert, obwohl noch signifikante Unterschiede bezüglich der prozentualen Anteile von naiven und Effektorzellen bestehen.

Auch die Anzahl der recent thymic emigrants (RTEs) erholt sich im gleichen Zeitraum. Dies ist beachtlich, weil der Thymus kurz nach Sepsisbeginn eine fast vollständige Depletion erfährt. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass diese frisch aus dem Thymus immigrierten Zellen zur Rekonstitution des peripheren T-Zell-Pools zumindest teilweise beitragen. Ein weiterer Mechanismus der T-Zell Erholung ist die homöostatische Proliferation, die bereits von einigen Arbeitsgruppen diskutiert wurde. Für diese These spricht unter anderem der erhöhte Anteil von detektierten Gedächtnis-/Effektor-Markern an den T-Zellen. Diese beiden Mechanismen scheinen parallel abzulaufen. Die vermutete langfristige Einschränkung der T-Zell-Rezeptor (TZR-) Diversität konnte mit Hilfe der next generation sequencing (NGS) nicht verifiziert werden.

Somit lässt sich bereits eine Woche nach Sepsisinduktion eine quantitative Rekonstitution der T-Zellen feststellen. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass hierbei nur Rückschlüsse auf die T-Zell Homöostase bei septischen Mäusen gezogen werden können. Beim Menschen kann sich die T-Zell Entwicklung im Rahmen einer Sepsis unterscheiden. Weitere Experimente mit menschlichem Blut könnten die hier charakterisierte Rolle des Thymus und der homöostatischen Proliferation für die T-Zell Rekonstitution sowie deren Auswirkungen auf die TZR-Diversität bei septischen PatientInnen verifizieren.

Trotz scheinbar normalisiertem T-Zell Kompartiment sind die septischen Mäuse nicht fähig, im Vergleich zu ihren gesunden Artgenossen, eine gleichwertige T-Zell-Antwort auf das immunisierte Aspergillus Antigen zu produzieren. Die wenigen Zellen, die auf

das Antigen reagieren, sind in ihrer Zytokinproduktion nicht eingeschränkt. Dies spricht gegen eine T-Zell- Exhaustion.

Die Ursache für diese eingeschränkte T-Zell-Antwort kann durch die hier präsentierten Experimente nicht abschließend geklärt werden. Es wurden jedoch auch Zellpopulationen quantitativ und qualitativ untersucht, welche regulatorische Funktionen ausüben. Besonders die B- regulatorischen (Bregs) Zellen, die vermehrt IL-10 exprimieren sowie die Myeloid derived supressor cells (MDSCs) sind langfristig erhöht. Für die letztgenannten konnte nachgewiesen werden, dass diese die Proliferation von aktivierten T-Zellen unterdrücken können. Hieraus kann gefolgert werden, dass die regulatorischen Zellen zumindest einen Beitrag zu der nach Sepsis bestehenden Immunsuppression leisten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch kleinere Lücken im T-Zell Rezeptor Repertoire oder ein Defekt der Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) die mangelnde Antwort der T-Zellen bedingen.

Das vielversprechende IL-7, das bereits in einer ersten Studie an septischen Patienten getestet wurde, beeinflusste hingegen die Mortalität in unseren Experimenten nicht. Grund dafür ist wahrscheinlich die verzögerte Applikation des Interleukins. Dies führt zu der Annahme, dass der protektive Effekt in vorangegangenen Studien vor allem durch das Verhindern der Sepsis induzierten Apoptose resultierte. Es wurde zwar beobachtet, dass IL-7 die T-Zellen quantitativ beeinflusst, dies hat jedoch kaum Auswirkungen auf die RTEs und die T-Zell Antwort gegenüber dem Aspergillus Antigen. Weiterhin fiel auf, dass MDSCs und Bregs durch IL-7 über einen längeren Zeitraum vermehrt nachgewiesen werden konnten. Es kann deswegen gefolgert werden, dass eine IL-7-Therapie neben den positiven Effekten auf die T-Lymphozyten auch die Immunsuppression verlängern kann. Bei zukünftigen IL-7 Studien sollte deshalb auch die regulatorische antiinflammatorische Komponente des Interleukins beachtet werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe R, Hirasawa H, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Watanabe E, Nakada TA, Hatano M, Tokuhisa T. 2008. Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients. *J Surg Res*, 147 (1):1-8.
- Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. 2010. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*, 34 Suppl 1:15-21.
- Ammer-Herrmenau C, Kulkarni U, Andreas N, Ungelenk M, Ravens S, Hubner C, Kather A, Kurth I, Bauer M, Kamradt T. 2019. Sepsis induces long-lasting impairments in CD4+ T-cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations. *PLoS One*, 14 (2):e0211716.
- Angus DC. 2010. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? *JAMA*, 304 (16):1833-1834.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29 (7):1303-1310.
- Arens C, Bajwa SA, Koch C, Siegler BH, Schneck E, Hecker A, Weiterer S, Lichtenstern C, Weigand MA, Uhle F. 2016. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. *Crit Care*, 20:93.
- Ayala A, Chung CS, Song GY, Chaudry IH. 2001. IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis. *Cytokine*, 14 (1):37-48.
- Baccala R, Theofilopoulos AN. 2005. The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. *Trends Immunol*, 26 (1):5-8.
- Bacher P, Kniemeyer O, Teutschbein J, Thon M, Vodisch M, Wartenberg D, Scharf DH, Koester-Eiserfunke N, Schutte M, Dubel S, Assenmacher M, Brakhage AA, Scheffold A. 2014. Identification of immunogenic antigens from *Aspergillus fumigatus* by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory CD4+ T cells. *J Immunol*, 193 (7):3332-3343.
- Bauer M, Coldewey SM, Leitner M, Loffler B, Weis S, Wetzker R. 2018. Deterioration of Organ Function As a Hallmark in Sepsis: The Cellular Perspective. *Front Immunol*, 9:1460.
- Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Gandia F, Gomez-Herreras JI, Gomez-Sanchez E, Heredia-Rodriguez M, Eiros JM, Kelvin DJ, Tamayo E. 2016. Defining immunological dysfunction in sepsis: A requisite tool for precision medicine. *J Infect*, 72 (5):525-536.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*, 30 (10):475-487.
- Bolotin DA, Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Shagin D, Ustyugova SV, Turchaninova MA, Lukyanov S, Lebedev YB, Chudakov DM. 2012. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol*, 42 (11):3073-3083.
- Borken F, Markwart R, Requardt RP, Schubert K, Spacek M, Verner M, Ruckriem S, Scherag A, Oehmichen F, Brunkhorst FM, Rubio I. 2017. Chronic Critical Illness from Sepsis Is Associated with an Enhanced TCR Response. *J Immunol*, 198 (12):4781-4791.
- Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS. 2014. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol*, 96 (5):767-777.

- Cabrera-Perez J, Condotta SA, James BR, Kashem SW, Brincks EL, Rai D, Kucaba TA, Badovinac VP, Griffith TS. 2015. Alterations in antigen-specific naive CD4 T cell precursors after sepsis impairs their responsiveness to pathogen challenge. *J Immunol*, 194 (4):1609-1620.
- Christou NV, Meakins JL, Gordon J, Yee J, Hassan-Zahraee M, Nohr CW, Shizgal HM, MacLean LD. 1995. The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later. *Ann Surg*, 222 (4):534-546; discussion 546-538.
- Condotta SA, Rai D, James BR, Griffith TS, Badovinac VP. 2013. Sustained and incomplete recovery of naive CD8+ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8+ T cell responses to infection. *J Immunol*, 190 (5):1991-2000.
- Condotta SA, Khan SH, Rai D, Griffith TS, Badovinac VP. 2015. Polymicrobial Sepsis Increases Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8+ T Cell Exhaustion. *J Immunol*, 195 (1):116-125.
- Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Warner E, Wallet SM, Wallet MA, O'Malley KA, Ramphal R, Clare-Salzer M, Efron PA, Mathews CE, Moldawer LL. 2011. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol*, 186 (1):195-202.
- Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, O'Malley KA, Wynn JL, Antonenko S, Al-Quran SZ, Swan R, Chung CS, Atkinson MA, Ramphal R, Gabrilovich DI, Reeves WH, Ayala A, Phillips J, Laface D, Heyworth PG, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*, 204 (6):1463-1474.
- den Braber I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, Westera L, Mogling R, de Boer AB, Willems N, Schrijver EH, Spierenburg G, Gaiser K, Mul E, Otto SA, Ruiter AF, Ackermans MT, Miedema F, Borghans JA, de Boer RJ, Tesselaar K. 2012. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*, 36 (2):288-297.
- Deshpande P, Cavanagh MM, Le Saux S, Singh K, Weyand CM, Goronzy JJ. 2013. IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J Immunol*, 190 (4):1416-1423.
- Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. 2014. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*, 42 (5):383-391.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Ernst B, Lee DS, Chang JM, Sprent J, Surh CD. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*, 11 (2):173-181.
- Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. 2006. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med*, 34 (10):2576-2582.
- Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. 2012. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One*, 7 (10):e47209.

- Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. 2005. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol*, 174 (6):3765-3772.
- Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. 2004. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med*, 30 (4):589-596.
- Fink PJ. 2013. The biology of recent thymic emigrants. *Annu Rev Immunol*, 31:31-50.
- Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA, Group I-RSSS. 1994. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med*, 22 (1):12-21.
- Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int*, 113 (10):159-166.
- Forel JM, Chiche L, Thomas G, Mancini J, Farnarier C, Cognet C, Guervilly C, Daumas A, Vely F, Xeridat F, Vivier E, Papazian L. 2012. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One*, 7 (12):e50446.
- Francois B, Jeannet R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, Monneret G, Rimmelé T, Blood T, Morre M, Gregoire A, Mayo GA, Blood J, Durum SK, Sherwood ER, Hotchkiss RS. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight*, 3 (5).
- Goldrath AW, Bevan MJ. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*, 11 (2):183-190.
- Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med*, 192 (4):557-564.
- Goldrath AW, Luckey CJ, Park R, Benoist C, Mathis D. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (48):16885-16890.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, Lefevre J, Camou F, Sarrat A, Gabinski C, Moreau JF, Blanco P. 2007. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med*, 33 (1):148-152.
- Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. 1997. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock*, 7 (4):247-253.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13 (12):862-874.
- Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. 2016. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*, 2:16045.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 27 (7):1230-1251.



- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. 2002. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*, 168 (5):2493-2500.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*, 166 (11):6952-6963.
- Izraelson M, Nakonechnaya TO, Moltedo B, Egorov ES, Kasatskaya SA, Putintseva EV, Mamedov IZ, Staroverov DB, Shemiakina, II, Zakharova MY, Davydov AN, Bolotin DA, Shugay M, Chudakov DM, Rudensky AY, Britanova OV. 2018. Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires. *Immunology*, 153 (2):133-144.
- Janeway CA Jr TP, Walport M, et al. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science.
- Kasten KR, Muenzer JT, Caldwell CC. 2010a. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 393 (1):28-31.
- Kasten KR, Tschop J, Adediran SG, Hildeman DA, Caldwell CC. 2010b. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock*, 34 (4):327-336.
- Kim HK, Waickman AT, Castro E, Flomerfelt FA, Hawk NV, Kapoor V, Telford WG, Gress RE. 2016. Distinct IL-7 signaling in recent thymic emigrants versus mature naive T cells controls T-cell homeostasis. *Eur J Immunol*, 46 (7):1669-1680.
- Kuhlhorn F, Rath M, Schmoeckel K, Cziupka K, Nguyen HH, Hildebrandt P, Hunig T, Sparwasser T, Huehn J, Potschke C, Broker BM. 2013. Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS One*, 8 (5):e65109.
- Kulkarni U, Herrmenau C, Win SJ, Bauer M, Kamradt T. 2018. IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One*, 13 (2):e0192304.
- Lambeck S, Weber M, Gonnert FA, Mrowka R, Bauer M. 2012. Comparison of sepsis-induced transcriptomic changes in a murine model to clinical blood samples identifies common response patterns. *Front Microbiol*, 3:284.
- Laydon DJ, Bangham CR, Asquith B. 2015. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370 (1675).
- Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelievre JD, Boue F, Molina JM, Rouzioux C, Avettand-Fenoel V, Croughs T, Beq S, Thiebaut R, Chene G, Morre M, Delfraissy JF. 2009. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest*, 119 (4):997-1007.
- Linder A, Guh D, Boyd JH, Walley KR, Anis AH, Russell JA. 2014. Long-term (10-year) mortality of younger previously healthy patients with severe sepsis/septic shock is worse than that of patients with nonseptic critical illness and of the general population. *Crit Care Med*, 42 (10):2211-2218.
- Lundstrom W, Fewkes NM, Mackall CL. 2012. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol*, 24 (3):218-224.
- Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. 1996. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol*, 156 (12):4609-4616.
- Markwart R, Condotta SA, Requardt RP, Borken F, Schubert K, Weigel C, Bauer M, Griffith TS, Forster M, Brunkhorst FM, Badovinac VP, Rubio I. 2014.

- Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PLoS One*, 9 (12):e115094.
- Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, Vanzant EL, Szpila BE, Mohr AM, Moore FA, Brakenridge SC, Brumback BA, Moldawer LL, Efron PA, the Sepsis CIRCI. 2017. Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Ann Surg*, 265 (4):827-834.
- Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM, Moore FA, Moldawer LL. 2017. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit Care Med*, 45 (2):253-262.
- Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*, 95 (2):193-198.
- Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*, 4 (2):123-132.
- Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. 2011. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*, 15 (4):R183.
- Ouwendijk WJ, Laing KJ, Verjans GM, Koelle DM. 2013. T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Curr Opin Virol*, 3 (4):452-460.
- Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. 2016. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ*, 353:i2375.
- Reinhart K, Karzai W. 2001. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S121-125.
- Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E, et al. 1993. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood*, 82 (9):2767-2773.
- Scharf DH, Remme N, Heinekamp T, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C. 2010. Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc*, 132 (29):10136-10141.
- Seemann S, Zohles F, Lupp A. 2017. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci*, 24 (1):60.
- Segal BH. 2009. Aspergillosis. *N Engl J Med*, 360 (18):1870-1884.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Inflammation, Host Response to Injury LSCRP. 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (9):3507-3512.
- Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. 2016. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):762-774.

- Shankar-Hari M, Rubenfeld GD. 2016. Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Curr Infect Dis Rep*, 18 (11):37.
- Shankar-Hari M, Ambler M, Mahalingasivam V, Jones A, Rowan K, Rubenfeld GD. 2016. Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: a systematic review of epidemiologic studies. *Crit Care*, 20:101.
- Shindo Y, Fuchs AG, Davis CG, Eitas T, Unsinger J, Burnham CD, Green JM, Morre M, Bochicchio GV, Hotchkiss RS. 2017. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Leukoc Biol*, 101 (2):543-554.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Skrupky LP, Kerby PW, Hotchkiss RS. 2011. Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects. *Anesthesiology*, 115 (6):1349-1362.
- Souza-Fonseca-Guimaraes F, Parlato M, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. 2012. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 188 (12):5850-5858.
- Sportes C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR, Fleisher TA, Krumlauf MC, Babb RR, Chow CK, Fry TJ, Engels J, Buffet R, Morre M, Amato RJ, Venzon DJ, Korngold R, Pecora A, Gress RE, Mackall CL. 2008. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med*, 205 (7):1701-1714.
- Surh CD, Sprent J. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*, 29 (6):848-862.
- Takao K, Miyakawa T. 2015. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (4):1167-1172.
- Tamayo E, Gomez E, Bustamante J, Gomez-Herreras JI, Fonteriz R, Bobillo F, Bermejo-Martin JF, Castrodeza J, Heredia M, Fierro I, Alvarez FJ. 2012. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *J Crit Care*, 27 (4):415 e411-411.
- Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (15):8732-8737.
- Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W, Steinmann J, Vidigal PG, Hutzler M, Pastille E, Westendorf AM, Buer J, Kehrmann J. 2015. Relevance of Foxp3(+) regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*, 146 (1):144-156.
- Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dunser MW. 2009. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*, 108 (6):1841-1847.
- Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Hotchkiss RS, Ferguson TA. 2009. Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *J Leukoc Biol*, 85 (3):382-390.
- Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, Morre M, Prakash PS, Caldwell CC, Dunne WM, Jr., Hotchkiss RS. 2012. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction

- and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis*, 206 (4):606-616.
- Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, Morre M, Hildeman DA, Caldwell CC, Hotchkiss RS. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol*, 184 (7):3768-3779.
- Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. 2004. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med*, 32 (11):2329-2331.
- Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G. 2012. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol*, 189 (10):5073-5081.
- Venet F, Filipe-Santos O, Lepape A, Malcus C, Poitevin-Later F, Grives A, Plantier N, Pasqual N, Monneret G. 2013. Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Crit Care Med*, 41 (1):111-119.
- Vrisekoop N, den Braber I, de Boer AB, Ruiter AF, Ackermans MT, van der Crabben SN, Schrijver EH, Spierenburg G, Sauerwein HP, Hazenberg MD, de Boer RJ, Miedema F, Borghans JA, Tesselaar K. 2008. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (16):6115-6120.
- Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, Pachot A, Brooks TL, Deych E, Shannon WD, Green JM, Storch GA, Hotchkiss RS. 2014. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One*, 9 (2):e98819.
- Williams KM, Hakim FT, Gress RE. 2007. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol*, 19 (5):318-330.
- Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. 2010. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*, 38 (5):1276-1283.
- Yende S, Linde-Zwirble W, Mayr F, Weissfeld LA, Reis S, Angus DC. 2014. Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 189 (9):1065-1074.
- Yende S, Austin S, Rhodes A, Finfer S, Opal S, Thompson T, Bozza FA, LaRosa SP, Ranieri VM, Angus DC. 2016. Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis: Analyses of Two International Trials. *Crit Care Med*, 44 (8):1461-1467.
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*, 188 (12):2205-2213.

## 8 Anhang

### 8.1 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

---

Name: Christoph Ammer-Herrmenau

Geburtsname: Herrmenau

Anschrift: Wilhelm-Weber-Straße 40  
37073 Göttingen

Geburtsdatum: 29.10.1990

Geburtsort: Potsdam

Familienstand: verheiratet

#### Ausbildung

---

1997-2004 Grundschule Wildenbruch

2004-2009 Wolkenberg Gymnasium Michendorf

Abitur (Note 1,1)

2010-2018 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

2012 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

2013-2015 Labortätigkeit im Rahmen der Promotion am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Jena

2016-2018 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

2017 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

2018 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

Seit August 2018 Assistenzarztstelle in der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinalen Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen

#### Praktische Kenntnisse

---

2009-2010 Zivildienstersatzleistung: Alten- und Schwerbehindertenpflege im Canaan Disability Home, Taiwan

2011	Pflegepraktika (Pädiatrie am Robert Koch Klinikum Apolda, Chirurgie am Universitätsklinikum Jena, Intensivstation am Universitätsklinikum Jena)
2012-2016	Studentische Hilfskraft in der Zentralen Notaufnahme des Uniklinikums Jena und Tutor für Biochemie und Physiologie
2013	Course on tropical medicine (Department of Microbiology Universitätsklinikum Jena)
2013-2016	Famulatur im Tropical infectious disease hospital Teku Kathmandu, Nepal Famulatur in der Allgemeinmedizinpraxis Dr. Assmann, Michendorf Famulatur in der Infektiologischen Ambulanz, Universitätsklinikum Jena Famulatur in der Allgemeinchirurgie im Kagando Mission Hospital, Uganda
2017-2018	1. Tertial Praktisches Jahr: Rheumatologie, Bruneck, Südtirol 2. Tertial Praktisches Jahr: Neurologie, Universitätsklinikum Jena 3. Tertial Praktisches Jahr: Chirurgie, Evangelisches Krankenhaus Weende, Göttingen

## **Publikationen**

---

Februar 2018	Kulkarni U (Co), Herrmenau C (Co), Win S.J., Bauer M, Kamradt T. (2018) IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. Plos One 13(2): e0192304
Februar 2019	Ammer-Herrmenau C, Kulkarni U, Andreas N, Ungelenk M, Hübner C, Kurth I, Ravens S, Kather A, Bauer M, Kamradt T. (2019) Sepsis induces long-lasting impairments in T helper cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations PLoS One. 14(2): e0211716

## **Sprachen**

---

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend
Chinesisch	gut

## **Engagement und weitere Interessen**

---

Mitarbeit bei MediNetz e.V.

Tandempartnerschaft Deutsch Arabisch

Mitglied im Patenschaftsprogramm Eine-Welt-Haus Jena e.V.

Sportklettern

Alpine Höhentouren

Göttingen, den 08.03.2019

## 8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mich bei dem Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke vor allem meinem Betreuer Prof. Dr. med. Kamradt für die Überlassung und Erarbeitung des Themas, sowie für die fachliche und persönliche Unterstützung während des gesamten Zeitraums. Herr Prof. Dr. med. Kamradt war jederzeit erreichbar und fand für jedes auftretende Problem eine Lösung. Er engagierte sich darüber hinaus dafür, dass ich ein Stipendium der deutschen Studienstiftung erhielt. Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. Kulkarni, Herr Dr. rer. nat. Nico Andreas und Frau Dr. rer. nat. Kather, die mich mit Rat und Tat in den verschiedenen Stadien der Arbeit unterstützten.

Weiterhin gilt allen Medizinischen technischen Assistentinnen des Instituts für Immunologie mein besonderer Dank. Ohne die Hilfe von Frau Freya Rost, Frau Karin Müller, Frau Katrin Hornung und Frau Claudia Kuchler wären die großen Experimente nicht zu bewältigen gewesen. Auch will ich Frau Annett Krause meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Erst durch ihre unermüdliche Hilfe gelangen viele organisatorische Angelegenheiten rund um die Doktorarbeit und die Tierversuchsanträge.

Für die komplexe Vorbereitung und Auswertung von den next generation sequencing Methodik konnte ich zur jeder möglichen und unmöglichen Zeit Rat von Dr. rer. nat. Martin Ungelenk, Prof. Dr. med. Ingo Kurth einholen. Dafür auch noch einmal an dieser Stelle ein Dankeschön. Die Bioinformatik-Auswertung der TZR Diversität war letztendlich möglich mittels eines Programmes, das Dr. rer. nat. Sarina Ravens für mich bereitstellte. Auch ihr möchte ich hiermit danken.

Mein sehr persönlicher Dank gilt zudem allen, die mich während des Studiums und dieser Arbeit begleiteten, motivierten und mir zur Seite standen. Dazu gehören meine Freunde, meine Familie und ganz besonders meine Frau Elisabeth Ammer, die mich unter anderem durch alle Höhen und Tiefen der Arbeit sowie die deutsche Grammatik begleitete.

Ich danke allen Beteiligten für ihre Hilfe und die sehr gute Zusammenarbeit.



### 8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof Dr. med. Thomas Kamradt und Frau Dr. rer. nat. Upasana Kulkarni,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Christoph Ammer-Herrmenau

Göttingen, 08.03.2019